

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Actividades celulolíticas, utilización de carbohidratos y
producción de etanol por clostridium thermocellum**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pablo Elpidio Hernández Cruza

Madrid, 2015

TP
1983

226

Pablo Elpidio Hernández Cruza



* 5 3 0 9 8 6 2 3 2 2 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-112189-4

ACTIVIDADES CELULOLITICAS, UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
Y PRODUCCION DE ETANOL POR CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM

Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 226/83

© Pablo Elpidio Hernandez Cruza
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-34881-1983

PABLO E. HERNANDEZ CRUZA

ACTIVIDADES CELULOLITICAS, UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
Y PRODUCCION DE ETANOL POR CLOSTRIDIUM
THERMOCELLUM

Director: Prof. Dr. Bernabe Sanz Perez
Catedratico de Bromatologia y
Microbiologia de los Alimentos

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y MICROBIOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS

1982

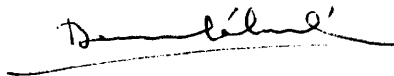
1

BERNABE SANZ PEREZ, Catedratico de Bromatologia y Microbiologia
de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad
Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la tesis titulada ACTIVIDADES CELULOLITICAS,
UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS Y PRODUCCION DE
ETANOL POR CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM de la que
es autor Don Pablo E. Hernandez Cruza, ha sido
realizada bajo la direccion conjunta del
Profesor Doctor Reinaldo F. Gomez del Instituto
Tecnologico de Massachusetts y del supraescrito,
cumpliendo las condiciones exigidas para optar
al Titulo de Doctor en Veterinaria.

Madrid a 9 de enero de 1982



AGRADECIMIENTOS

Cuando la escasez de energia que estamos padeciendo me llevo' a plantearme en el Departamento de Higiene y Microbiologia de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid, la posibilidad de aprovechar con fines energéticos la fermentación de desechos agricolas, me encuentre con una cariñosa acogida por parte de uno de los directores de esta tesis, el profesor Dr. Bernabé Sanz Perez, a quien hago publico mi más sincero agradecimiento por haberme ayudado a iniciar, continuar y completar esta tesis. Sin su generosa cooperación y ayuda ninguna de estas tres cosas hubiera sido posible. La consecución de una beca para el Instituto Tecnológico de Massachusetts me permitió continuar en este prestigioso centro y bajo la supervision del profesor Dr. Reinaldo F. Gómez, codirector de esta tesis, el trabajo iniciado en Madrid. A él, como a los demas compañeros del MIT, hago patentes mis mas calurosas gracias.

Gracias tambien al Dr. Pascual López Lorenzo por haberme ayudado a venir a MIT y al resto de la gente del Departamento por haberme guiado en mis primeros pasos por el laboratorio.

Pepe, Emilio, Alfonso, Pablo, Cary, Chema, Miren, y Pei de muchas maneras me han hecho más agradable el tiempo en MIT. De Moncho podria decir tantas cosas, que no cabrían aquí. Fifa en un tiempo record ha escrito esto a maquina. Gracias a todos.

INDICE

	<u>Pagina</u>
Titulo	1
Agradecimiento	2
Indice General	3
Indice de Figuras	6
Indice de Tablas	10
I. Introduccion	13
II. Revision bibliografica	
A. Introduccion	16
B. Aislamiento de los microorganismos que degradan la celulosa	17
C. Propiedades fisiologicas y metabolismo de carbohidratos en <u>C. thermocellum</u>	17
D. Actividades Celuloliticas de <u>C. thermocellum</u>	19
E. Mecanismos involucrados en el transporte de azucares por las bacterias	25
III. Exposicion General del Problema a Investigar	35
IV. Materiales y Metodos	
A. Microorganismos y medios de cultivo	37
B. Metodos de cultivo anaerobicos	38
C. Crecimiento del microorganismo	41
D. Determinacion de la masa celular	41
E. Determinacion de la proteina	43
F. Determinacion de los azucares reductores solubles	45
G. Analisis de los productos de la fermentacion	48
H. Actividades enzimaticas extracelulares	49

Página

I. Electroforesis en geles de poliacrilamida	55
J. Determinacion de las actividades enzimaticas posiblemente involucradas en el transporte de azucares	56
K. Determinacion de la incorporacion del azucar ($^{14}\text{C-U}$)	61
L. Determinacion de la concentracion de azucares fosforilados en los sobrenadantes de celulas permeabilizadas.	63
M. Fosforilizacion de la glucosa en celulas permeabilizadas	65
N. Analisis Estadisticos	65
V. Resultados	
A. Evaluacion de <u>C. thermocellum</u> como productor de etanol	67
B. Evaluacion de dos cepas de <u>C. thermocellum</u> y del microorganismo HG2, por sus actividades "Celulasa" y Xilanasa"	80
C. Utilizacion de carbohidratos por <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405	90
D. Crecimiento y cinetica de la utilizacion de azucares, por <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405, cuando crece en una mezcla de celobiosa y glucosa	111
E. Transporte de glucosa en <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405	144
VI. Discusion	
A. Evaluacion de las cepas de <u>C. thermocellum</u> y de los microorganismos del grupo HG, por su capacidad de producir etanol y enzimas con actividades celuloliticas	173
B. Utilizacion de carbohidratos por <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405	176
C. Energizacion del sistema activo del transporte de glucosa, en <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405	184

Pagina

VII. Conclusiones	188
VIII. Problemas a Resolver	193
Apendice I: Modelos moleculares de regulacion genetica posiblemente involucrados en el transporte y en la utilizacion de glucosa por <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405	196
Apendice II: Los elementos geneticos translocables como reguladores de la expresion genetica.....	202
IX. Bibliografia	206

FIGURAS

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
1	Ruta metabolica de la fermentacion de la glucosa a etanol, acido acetico y acido lactico.	20
2	Curva patron para determinar el valor del peso celular seco de <u>C. thermocellum</u>	42
3	Curva patron para la determinacion de proteina por el metodo de Lowry.	44
4	Curva patron para la determinacion de azucares reductores.	46
5	Curva patron para la determinacion de acido lactico.	50
6	Curva patron para la determinacion de actividades enzimaticas extracelulares.	52
7	Crecimiento de <u>C. thermocellum</u> en celobiosa y glucosa.	92
8	Crecimiento en celobiosa y glucosa de <u>C. thermocellum</u> adaptado a glucosa.	94
9	Crecimiento de <u>C. thermocellum</u> en un medio complejo y en un medio minimo.	99
10	Efecto del pH inicial en el crecimiento de celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa.	102
11	Crecimiento en una mezcla de celobiosa y glucosa de <u>C. thermocellum</u> no adaptado a glucosa.	104
12	Efecto de la concentracion inicial de carbohidratos en la concentracion final de celulas de <u>C. thermocellum</u> , no adaptado a glucosa.	108
13	Efecto de la concentracion inicial de carbohidratos en la concentracion final de celulas de <u>C. thermocellum</u> , adaptado a glucosa.	109

FIGURAS (continuacion)

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
14	Cinetica del crecimiento y de la formacion de productos finales, en cultivos de <u>C. thermocellum</u> adaptados a glucosa, cuando crecen en celobiosa.....	112
15	Cinetica del crecimiento y de la formacion de productos finales, en cultivos de <u>C. thermocellum</u> adaptados a glucosa, cuando crecen en esta hexosa.....	113
16	Crecimiento y utilizacion de azucares por celulas de <u>C. thermocellum</u> , no adaptado a crecer en glucosa.....	117
17	Crecimiento y utilizacion de azucares por celulas de <u>C. thermocellum</u> , adaptadas a crecer en glucosa.....	119
18	Efecto de la adiccion de glucosa a celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en este azucar cuando crece exponencialmente en ella.....	122
19	Actividad celobiosa fosforilasa. Inhibicion <u>in vitro</u> por la glucosa. Analisis estadistico de los datos experimentales por represion lineal.....	128
20	Actividad celobiosa fosforilasa. Inhibicion <u>in vitro</u> por la glucosa. Analisis estadistico de los datos experimentales por represion no lineal.....	130
21	Diagrama de Lineweaver-Burk para estimar la actividad celobiosa fosforilasa. Inhibicion <u>in vitro</u> por glucosa.....	131
22	Actividad β glucosidasa en <u>C. thermocellum</u>	132
23	Actividad β -glucosidasa en presencia de fosforo inorganico. Inhibicion <u>in vitro</u> por glucosa.....	138
24	Diagrama de Lineweaver-Burk para estimar la actividad β -glucosidasa en presencia de fosforo inorganico. Inhibicion <u>in vitro</u> por glucosa.....	139

FIGURAS (Continuacion)

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
25	Actividad β -glucosidasa en ausencia de fosforo inorganico. Inhibicion <u>in vitro</u> por glucosa.	140
26	Diagrama de Lineweaver-Burk para estimar la actividad β -glucosidasa en ausencia de fosforo inorganico. Inhibicion <u>in vitro</u> por la glucosa.	141
27	Crecimiento y consumo de azucares por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa, despues de transferidas 100 generaciones en celobiosa.	142
28	Crecimiento y consumo de azucares por el cultivo de la Figura 27 despues de crecer en celulosa durante 15 generaciones.	143
29	Incorporacion de glucosa por las celulas de <u>C. thermocellum</u> a una concentracion exogena de glucosa de 1 mM.	145
30	Incorporacion de glucosa por las celulas de <u>C. thermocellum</u> , a varias concentraciones exogenas de glucosa.	147
31	Diagrama de Lineweaver-Burk para determinar la velocidad inicial de incorporacion de glucosa por celulas de <u>C. thermocellum</u>	149
32	Velocidades de crecimiento especificas, en celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa.	150
33	Rendimiento celular de celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa.	151
34	Asimilacion de glucosa en funcion de su concentracion extracelular por celulas de <u>C. thermocellum</u> , adaptadas a crecer en glucosa.	153

FIGURAS (Continuacion)

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
35	Incorporacion de glucosa por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en este azucar, en presencia y ausencia del Fluoruro Sodico	159
36	Incorporacion de glucosa por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en este azucar en presencia y ausencia del Arsenato.....	160
37	Incorporacion de glucosa por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en este azucar en presencia de Dinitrofenol.....	163
38	Incorporacion de glucosa y de α MG a una concentracion exogena de 1mM por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas y sin adaptar a crecer en glucosa.....	167
39	Modelo de inversion por recombinacion especifica de la region que controla la actividad <u>Gut</u>	199

TABLAS

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
I	Analisis quimico de algunos residuos agricolas y de la madera.....	26
II	Composicion del medio de cultivo CM-4.....	39
III	Composicion del medio minimo de cultivo.....	40
IV	Mezcla reaccionante para la actividad glucoquinasa.....	57
V	Mezcla reaccionante para la actividad celobiosa fosforilasa.....	59
VI	Mezcla reaccionante para la actividad PEP- fosfotransferasa.....	62
VII	Mezcla reaccionante para la determinacion de azucares fosforilados en los sobrenadantes de celulas permeabilizadas.....	64
VIII	Crecimiento en celobiosa de varias cepas de <u>C. thermocellum</u>	69
IX	Crecimiento en xilosa de varias cepas de <u>C. thermocellum</u>	70
X	Crecimiento en xilano de varias cepas de <u>C.</u> <u>thermocellum</u> y de los microorganismos HG.....	71
XI	Crecimiento de los microorganismos HG en xilosa y celobiosa.....	73
XII	Produccion de etanol a partir de celobiosa por varias cepas de <u>C. thermocellum</u> y de los microorganismos HG.....	74
XIII	Produccion de etanol a partir de xilano por los microorganismos del grupo HG.....	76
XIV	Produccion de etanol a partir de xilosa por microorganismos del grup HG.....	77
XV	Produccion de etanol a partir de glucosa por por los microorganismos HG.....	78

TABLAS (Continuacion)

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
XVI	Toxicidad del etanol para las cepas de <u>C. thermocellum</u> y para los microorganismos del grupo HG.	79
XVII	Crecimiento y acumulacion de azucares reductores en dos cepas de <u>C. thermocellum</u> y en el microorganismo HG2, cuando crecen en xilano.....	82
XVIII	Efecto de la fuente de carbono en la expresion de las actividades enzimaticas extracelulares del microorganismo HG2.	83
XIX	Desarrollo de las actividades enzimaticas extracelulares de la cepa HG2, cuando crecen en xilano o xilosa.....	84
XX	Efecto de la fuente de carbono en la expresion de las actividades enzimaticas extracelulares de <u>C. thermocellum</u>	86
XXI	Indice de inhibicion por la xilosa de <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405.....	87
XXII	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS y natural) de las proteinas extracelulares de <u>C. thermocellum</u> , cepas ATCC-27405 y LQ8 y del microorganismo HG2.....	88
XXIII	Valores MPN de <u>C. thermocellum</u> al crecer en celobiosa o glucosa.....	96
XXIV	Valores MPN de <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405 durante el periodo de latencia en los tubos con CM4-glucosa.	97
XXV	Rendimientos celulares aparentes de <u>C. thermocellum</u> cuando crece en celobiosa o en glucosa.	110
XXVI	Eficiencias de conversion a productos finales, de celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa, cuando se desarrollan en celobiosa o en glucosa.	115

TABLAS (Continuacion)

<u>Numero</u>	<u>Titulo</u>	<u>Pagina</u>
XXVII	Efecto de la glucosa en el crecimiento en celobiosa de celulas de <u>C. thermocellum</u> no adaptadas a glucosa,.....	124
XXVIII	Actividad celobiosa fosforilasa de <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405.....	125
XXIX	Inhibicion <u>in vitro</u> de la actividad celobiosa fosforilasa por la glucosa.....	127
XXX	Actividad β -glucosidasa de <u>C. thermocellum</u> ATCC-27405.....	135
XXXI	Inhibicion <u>in vitro</u> de la actividad β -glucosidasa por la glucosa,.....	136
XXXII	Actividades de las enzimas presuntamente implicadas en la utilizacion de azucares por <u>C. thermocellum</u> ,.....	154
XXXIII	Efecto de diferentes inhibidores en el crecimiento <u>in vitro</u> en celobiosa o glucosa de celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa,.....	156
XXXIV	Efecto de FNa y ASO_4HNa_2 en el crecimiento <u>in vitro</u> y en la incorporacion de glucosa <u>in vitro</u> por celulas de <u>C. thermocellum</u> adaptadas a crecer en glucosa.....	161
XXXV	Efecto del DNP en el crecimiento <u>in vitro</u> y en la incorporacion de glucosa <u>in vitro</u> por celulas de <u>C. thermocellum</u> , adaptadas a crecer en glucosa.....	164
XXXVI	Efecto de la α -MG en el crecimiento <u>in vitro</u> de <u>C. thermocellum</u> ,.....	166
XXXVII	Fosforilizacion <u>in vitro</u> de la glucosa, 2-DOG y α -MG en celulas permeabilizadas de <u>C. thermocellum</u> ,.....	170
XXXVIII	Fosforilizacion <u>in vitro</u> de la glucosa, en celulas permeabilizadas de <u>C. thermocellum</u> , con ayuda de un metodo para la determinacion de la actividad glucoquinasa,.....	172

I. INTRODUCCION

Nuestra sociedad se enfrenta hoy con los problemas de una fuerte disminucion de las reservas de combustibles liquidos y con la acumulacion de los residuos organicos producidos por los municipios, las explotaciones agricolas y ganaderas y las industrias. La posible conversion de las materias primas facilmente renovables o de los residuos organicos en productos quimicos y combustibles liquidos constituye hoy un reto tremendo para nuestra comunidad cientifica. Los microorganismos anaerobicos pueden ser la base de la produccion microbiana de productos quimicos y combustibles liquidos. Esto es, como consecuencia del catabolismo de la materia organica en ausencia de oxigeno se pueden producir una serie de compuestos organicos reducidos (ej. etanol, metano, acido acetico, butanol) en lugar de la combustion aerobica completa de dicha materia organica a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (Zeikus, 1980).

La disminucion de las reservas de combustibles liquidos fosiles ha dado lugar a que el problema del abastecimiento de energia sea cada vez mas grave en todos los paises del mundo. Esta crisis energetica se debe en gran medida, a la necesidad de grandes cantidades de combustibles liquidos, muchos de los cuales se consumen principalmente por la industria automotriz. Estos combustibles liquidos provienen en su mayor parte del petroleo. Para que un pais pueda reducir su dependencia de la importacion de petroleo necesita desarrollar fuentes de energia alternativas y preferiblemente renovables. »

Dos fuentes de energía alternativas para la producción de combustibles líquidos son por una parte los combustibles fósiles no renovables como el carbón, el aceite de pizarras bituminosas y la turba y por otra las materias primas celulósicas, que son fácilmente renovables. Entre la biomasa celulósica adecuada para la producción de los combustibles líquidos se incluyen los tallos del maíz, la remolacha y la caña de azúcar, la paja de cereales (arroz, trigo, cebada, sorgo, etc.), así como toda una serie de materiales celulósicos residuales de la agricultura y bosques.

La idea de producir un combustible líquido, etanol, a partir de la biomasa celulósica no es nada nuevo. En 1939 había en los Estados Unidos 36 plantas industriales produciendo un total de unos 800 millones de litros de etanol por año, de los cuales el 7%, o sea 56 millones de litros, se obtenían usando cereales como materia prima. El etanol puede ser mezclado con la gasolina para obtener "gasohol", un combustible tan bueno como la gasolina; además, a partir del etanol se pueden obtener por síntesis más de 200 productos químicos (Gómez, 1980; Ryu y Mandels, 1980).

Hasta ahora, el proceso utilizado para la conversión de la biomasa celulósica en etanol comprendía dos fases: en la primera fase el material celulósico era hidrolizado por un tratamiento químico o enzimático, y en la segunda fase los productos de dicha hidrólisis (azúcares reductores) eran sometidos a fermentación con una levadura, *Sacharomyces cerevisiae*, para obtener etanol. Sin embargo, teóricamente es posible la conversión de los materiales celulósicos complejos en etanol en una sola fase, reduciéndose así enormemente los gastos de capital (Wang *et al.*, 1976-1980). Constituiría la base de este proceso la utilización de un microorganismo que fuese capaz de producir etanol por fermentación directa de los sustratos celulósicos complejos.

Como base de este trabajo hemos utilizado Clostridium thermocellum, un microorganismo anaerobico, termofilico y celololitico (Ng, Weimer y Zeikus, 1977) el cual es capaz de producir etanol por fermentacion directa de los sustratos celulosicos complejos.

El trabajo llevado a cabo ha permitido identificar los factores limitantes en la produccion de etanol por C. thermocellum, conocer las clases de actividades celuloliticas presentes en su sistema celulolitico extracelular, identificar los azucares solubles simples utilizados por este microorganismo para crecer y ha dado lugar a proponer modelos teoricos de regulacion genetica quizas involucrados en el transporte y utilizacion de la glucosa.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

Un esfuerzo considerable se esta hoy llevando a cabo para estudiar la posible conversion de las materias primas renovables en combustibles liquidos, productos quimicos o ambos (Bullock, 1979; Flickinger y Tsao, 1978; Pape, 1976; Tsao et al., 1978; Wilke, 1975, Keenan, 1979, Wang et al., 1976-1980).

Las bacterias anaerobicas con capacidad de fermentar los polimeros biologicos presentan ciertas ventajas, en especial los microorganismos termofilicos con actividades celulotiticas. En el caso concreto de la produccion de etanol a partir de sustratos celulosicos complejos, las ventajas ofrecidas por un microorganismo anaerobico, termofilico y celulolitico serian las siguientes (Zeikus, 1980 y Wang et al., 1976-1980):

1. La conversion de la celulosa en etanol se conseguiria en una sola fase, reduciendose asi enormemente los gasto de capital.
2. Como consecuencia de su crecimiento a temperaturas altas (50-70°C) y de sus propiedades macromoleculares unicas, las bacterias termofilicas poseen gran velocidad metabolica, enzimas muy estables y menor masa celular, pero mayor rendimiento en productos finales que las especies mesofilicas similares.
3. Debido a la anaerobiosis, se evitan totalmente los problemas de aireacion y de transferencia de oxigeno en el fermentador.
4. Las altas temperaturas de crecimiento disminuyen los gastos de refrigeracion, al disminuir enormemente el gradiente de enfriamiento.

5. Los procesos termofilicos son mas estables a la contaminacion y pueden facilitar la obtencion directa del producto final en los procesos de fermentacion-destilacion directa bajo presion reducida.
6. Las bacterias, como tales microorganismos, son mas asequibles a las manipulaciones geneticas, incluidas las tecnicas de ingenieria genetica recientemente desarrolladas.

B. Aislamiento de los Microorganismos que Degradan la Celulosa

Los microorganismos termofilicos con capacidad de fermentar los productos celulosicos estan ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden encontrarse en muchos tipos de suelos. El estiercol de caballos es tambien una buena fuente para aislarlos (McBee, 1944).

C. Propiedades Fisiologicas y Metabolismo de los Carbohidratos en el C. thermocellum

1. Propiedades Fisiologicas

Existe una uniformidad de criterio al definir C. thermocellum (Buchanan y Gibbons, 1974; Prevot, 1966) como un bacilo termofilico y gram negativo (0.6-0.7 por 2.5-5 μ m), movil, con espora terminal y capaz de utilizar la celulosa como la unica fuente de carbono. Sin embargo, otras propiedades fisiologicas, como la capacidad de fermentar otros azucares y los productos finales de su metabolismo han sido objeto de gran discusion.

McBee (1950) definio a C. thermocellum como un anaerobio termofilico, capaz de crecer en la celulosa, hemicelulosa, celobiosa y xilosa, pero incapaz

de fermentar la glucosa, fructosa, manosa y otros carbohidratos. Vidrine y Quinn (1969) señalaron que con concentraciones mas altas de extracto de levadura en el medio de cultivo (0.45%) la cepa Quinn de C.thermocellum, era tambien capaz de fermentar la glucosa y la fructosa. Patni y Alexander (1971) confirmaron este dato con C.thermocellum cepa 651, encontrando que en los extractos celulares existia una glucoquinasa activa y otras enzimas glicoliticas.

Recientemente, Ng, Weimer y Zeikus (1976; 1977) han descrito tres cepas de C. thermocellum denominadas LQ8, N1 y H1, que fermentan la celulosa pero no la glucosa, xilosa, sacarosa o trealosa. La composicion en bases del ADN (% G+C) fue de 38.1, 39.5 y 38.8 en las cepas N1, LQ8 y H1, respectivamente.

2. Metabolismo de los Carbohidratos

Igual que otras especies anaerobicas y termofilicas (Hollaus y Sleyter, 1972; Hsu y Ordal, 1970; Zeikus et al., 1979; Lamed y Zeikus, 1980), C.thermocellum produce por fermentacion etanol y simultaneamente otros productos finales como H_2 , CO_2 , acido lactico y acido acetico. El conocimiento de las rutas cetabolicas por las que este microorganismo produce estos productos finales tiene que ser por lo tanto util en la busqueda de mutantes y en la seleccion de cepas, asi como en el desarrollo de condiciones de cultivo optimas para la obtencion de mayores rendimientos.

La ruta metabolica de Embden-Meyerhoff-Parnas es la utilizada por este microorganismo (Patni y Alexander, 1971). La produccion de ATP por esta ruta



metabolica depende de la oxidacion del gliceraldehido -3-fosfato a 3-fosfo-glicerato con la consiguiente reduccion del NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Ya que la cantidad total de NAD^+ en la celula es muy limitada, la fermentacion cesaria muy rapidamente si el NADH no se reoxidase de nuevo durante el metabolismo del piruvato. Los microbios han desarrollado una variedad de rutas metabolicas para metabolizar el piruvato y algunas de ellas, producen ademas ATP. En el catabolismo de la glucosa, los clostridios transforman parte del piruvato en acido lactico y el resto se convierte, via acetil-CoA, en acido acetico y etanol. La reaccion mas importante en este tipo de fermentacion, es por lo tanto la oxidacion del piruvato a acetil-CoA, en reaccion catalizada por la enzima piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa (Jungerman et al., 1973; Thaver et al., 1977; Ujeda y Rajinovich, 1971). Un esquema de esta ruta metabolica se presenta en la Figura 1 (S. Wang, 1979).

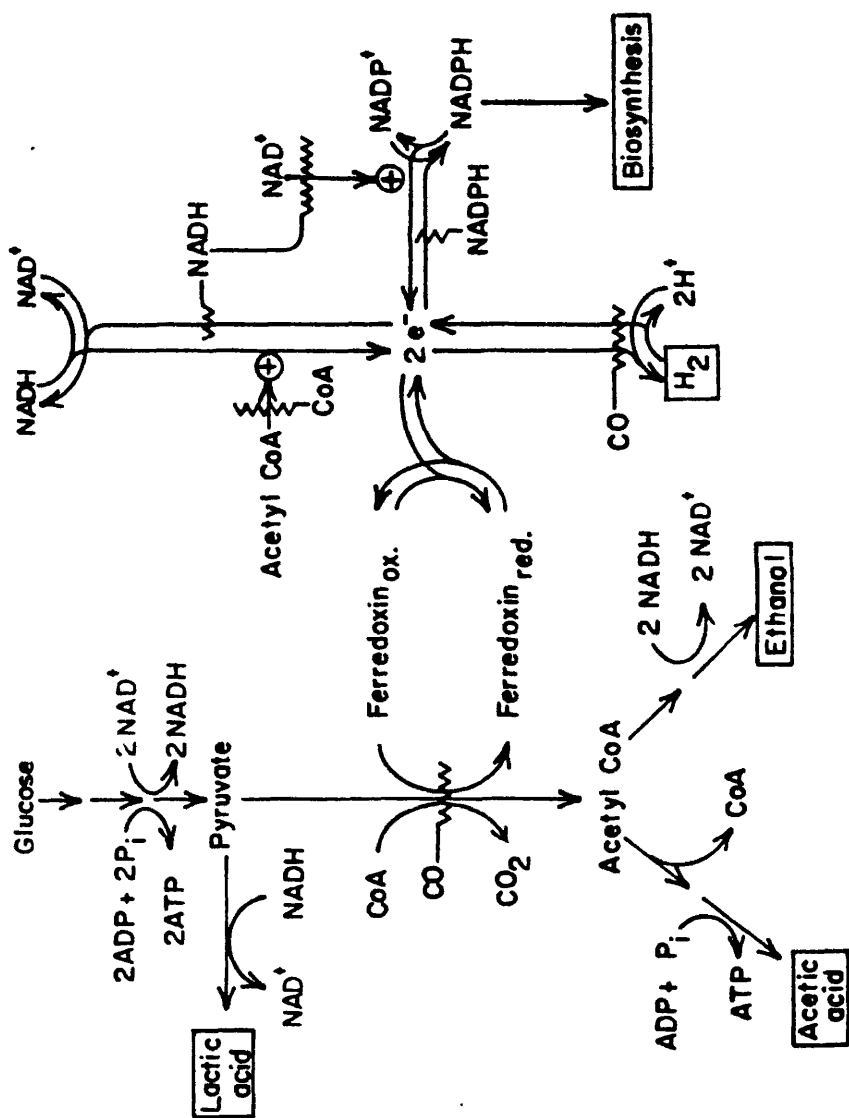
D. Actividades Celuloticas del C.thermocellum

Casi todos los estudios recientes sobre la fermentacion microbiana de la Celulosa se han limitado al hongo aerobico, Trichoderma viridae o Trichoderma resei. Se han aislado otras muchas bacterias, levaduras y hongos con actividades celuloticas (Mandels y Andreotti, 1978) pero la mayor parte de ellos no producen una cantidad suficiente de celulosas extracelulares como para ser empleadas industrialmente en un futuro proximo.

FIGURA I

Ruta metabolica de la fermentacion de la glucosa a Etanol, acido Acetico y
acido Lactico

 Activacion
 Inhibicion



El hongo Trichoderma produce una celulosa completa con todos los componentes requeridos para la hidrólisis de la celulosa cristalina. Sin embargo, las desventajas de esta celulosa son: que es inducible, que se adsorbe fuertemente al sustrato, que su síntesis es inhibida por la acumulación en el medio de los azúcares solubles glucosa y celobiosa, que contiene niveles muy bajos de actividad celobiasa y que se inactiva lentamente a 50°C (Mandels y Andreotti, 1978).

El mecanismo de la hidrólisis enzimática de la celulosa no se conoce completamente, pero parece ser que está basado en la acción concertada de las endo- β -glucanasas, exo- β -glucanasas y celobiasas. Las endo- β -glucanasas son enzimas que hidrolizan al azar las cadenas de celulosa provocando una rápida reducción de la longitud de las cadenas junto con la aparición de un pequeño número de grupos reductores. Las exo- β -glucanasas son enzimas que remueven unidades de glucosa o de celobiosa a partir de los grupos finales no reductores de las cadenas de celulosa resultando en un rápido incremento del número de azúcares reductores con pequeños cambios en la viscosidad de la solución. La celobiasa hidroliza la celobiosa a glucosa.

Los métodos de laboratorio empleados para determinar estas actividades celulolíticas se complican por la multiplicidad de enzimas y sustratos presentes durante la reacción. Las celobiasas (β -glucosidasas) se pueden determinar midiendo su actividad hidrolítica en sustratos bien definidos como

celobiosa, salicina o p-nitrofenil- β -D-glucosido. Las endo- β -glucanasas se pueden determinar midiendo el numero de equivalentes de azucres reductores liberados a partir de la carboximetilcelulosa (Ng et al, 1977) o determinando la reduccion de la viscosidad de una solucion de carboximetilcelulosa en presencia de la enzima (Wood y McCrae, 1978).

Las exo-B-glucanasas se pueden determinar midiendo el numero de equivalentes de azucres reductores libres liberados por la incubacion de los extractos con un substrato celulosico altamente microcristalino como el papel de filtro Whatman no.1 (Mandels y Stenberg, 1976) o la celulosa microcristalina Avicel (Berghem y Peterson, 1973).

Aunque la mayor parte de los estudios sobre la degradacion microbiana de los materiales celulosicos se ha limitado a las bacterias y hongos mesofilicos, se dispone ya de alguna informacion sobre el sistema celulolitico de algunas cepas de C.thermocellum.

Ng, Weimer y Zeikus (1977) han señalado la presencia de una "celulasa" extracelular activa en el liquido sobrenadante de la cepa LQ8 de C.thermocellum, crecida en celulosa. Esta "celulosa" fue estable al oxigeno, al calor (70°C por 45 minutos) y se absorbio fuertemente al substrato, celulosa. Las actividades β -1-4 endo y exoglucanasas estaban presentes en esta fraccion y su accion concertada sobre la celulosa produjo celodextrinas y celobiosa. Sin embargo, la actividad celobiasa fue nula en esta fraccion extracelular.

Ait, Creuzet, y Forget (1979) tambien han señalado la presencia de actividades "carboximetilcelulosa" y "celulasa" en el liquido sobrenadante de la cepa NCIB 10682 de C.thermocellum crecida en celulosa. Los intentos para purificar la actividad "celulasa", por filtracion en geles de Sephadex o por cromatografia en DEAE-celulosa fueron infructuosos. Por electroforesis en geles de poliacrilamida, se detecto la presencia de una sola banda proteica con actividad "celulasa". Sin embargo, la electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) puso de manifiesto que existian al menos cinco proteínas con aquella actividad. La presencia conjunta de las actividades "carboximetilcelulosa" y "celulasa" en la misma fraccion, sugiere la agregacion de estas enzimas en un complejo soluble de peso molecular constante.

La mayor parte de los microorganismos celuloliticos poseen tambien una actividad extracelular β -glucosidasa (celobiasa) (Reese, 1956; Berghem y Peterson, 1974; Deshpande et al., 1978) la cual hidroliza las celodextrinas y la celobiosa a glucosa. Ait, Creuzet y Cattaneo (1979) han encontrado la actividad β -glucosidasa, en la cepa NCIB 10682 de C.thermocellum, asociada a las celulas y no en el medio extracelular. Experimentos con shocks osmoticos confirmaron la localizacion de sta enzima en el espacio periplasmico celular.

La presencia de las enzimas celodextrin fosforilasa y celobiosa fosforilasa tambien ha sido descrita en C.thermocellum. Estas enzimas catalizan las

Las siguientes reacciones:



La fosforolisis de la celobiosa fue descrita por primera vez por Sih y McBee (1957). Este sistema fue estudiado también por Alexander *et al.* (1958-1969) en la cepa 651 de *C.thermocellum*. Estas dos actividades se encontraron siempre asociadas a las células y nunca en el medio extracelular.

Sin embargo, la importancia y la regulación de la actividad de todas estas enzimas en la degradación de la celulosa, así como su papel en la incorporación y en el catabolismo de los productos hidrolíticos de cada reacción, no se ha elucidado todavía plenamente.

E. Mecanismos Involucrados en el Transporte de Azúcares

I. Introducción

Las bacterias anaerobias, termofilicas y celulolíticas como *C.thermocellum*, ocupan un ambiente único y orgánicamente complejo en el que una gran variedad de sustratos están presentes simultáneamente y en concentraciones variables en el medio de cultivo. Las adaptaciones fisiológicas que permiten a estas bacterias crecer en este medio no son todavía suficientemente conocidas. El transporte a través de la membrana es la primera inter-

Tabla I

Composicion quimica de Algunos Residuos Agricolas y de la Madera (en Peso Seco)

Material	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Zuro de Maiz	15	35	15
Paja de Trigo	19	39	14
Paja de Arroz	17	39	10
Glumas de Avena	29.5	33.7	13.5
Bagazo	20.4	41.3	19.9
Madera de Pino	7.4	52.3	26.6
Madera de Encina	19.6	44.8	24.8

accion metabolica de estas bacterias con los productos de la hidrolisis de los materiales celulosicos. Por lo tanto, la caracterizacion de los sistemas de transporte y su regulacion es de gran importancia para entender los mecanismos fisiologicos que permiten a este microorganismo crecer en sustratos tan complejos.

La Tabla I muestra la composicion quimica de algunos residuos ligno-celulosicos (Dunning y Lathrop, 1945). Los componentes principales son la hemicelulosa, celulosa y lignina. La transformacion biologica de las fracciones hemicelulosa y celulosa requiere que estas fracciones sean primero hidrolizadas a azucares solubles. Sin embargo, la lignina es altamente resistente a esta degradacion enzimatica debido a su estructura. La lignina es un polimero complejo compuesto de alcoholes p-hidrocinaimilicos. Los monomeros estan unidos de tal manera que forman una estructura tridimensional altamente compleja, muy dificil de romper (Keehan, 1979).

2. Transporte de Sustratos Energeticos y de los Productos Finales del Catabolismo en las Bacterias

La primera y la ultima etapa de todos los procesos catabolicos es el paso de los sustratos dentro de las celulas y de los productos finales del metabolismo fuera de ellas. A primera vista, uno deberia sospechar que ambos procesos podian ser "pasivos": se dispone de altos gradientes de concentracion de sustrato y de productos (especialmente en organismos unicelulares mantenidos en condiciones de laboratorio) asi que ambos, productos y sustratos,

podian pasar a traves de la membrana por difusion debido a sus gradientes de concentracion positivos. Investigaciones intensas sobre la asimilacion de sustratos por los microorganismos, que han sido criticamente revisados, han revelado que estos procesos no son del todo "pasivos" (Mitchell, 1967, 1973; Harold, 1972; Kaback, 1972; Boos, 1974; Hamilton, 1975; Saier, 1977; Dills et al., 1980). Posiblemente esto indica que en el habitaculo natural las concentraciones de sustrato pueden ser muy bajas lo que requiere su acumulacion "activa" dentro de la celula para un catabolismo efectivo. Los estudios sobre excrecion de los productos finales del metabolismo celular son escasos. Ello puede ser debido a que en los procesos aerobicos el producto final del metabolismo es el CO_2 que puede dejar la celula por difusion no-ionica (Thaver et al., 1977)

El cambio de energia libre standard en el movimiento de una molecula sin carga de un lado de una membrana a una concentracion C_{fue} , hacia el otro lado a una concentracion $C_{\text{den.}}$, viene dado por la expresion,

$$\Delta G^* = 2.3 RT \log \frac{C_{\text{fue}}}{C_{\text{den}}}, \text{ en donde}$$

ΔG^* se expresa en cal/mol

$R = 1,987 \text{ cal/}^\circ\text{K.mol}$

T en $^\circ\text{K}$

C en concentraciones molares

Cuando el valor de ΔG^* es negativo la reaccion tiene lugar espontaneamente, pero cuando el valor de ΔG^* es positivo, la energia necesaria para el movi-

miento de las moléculas tiene que suministrarse de alguna manera.

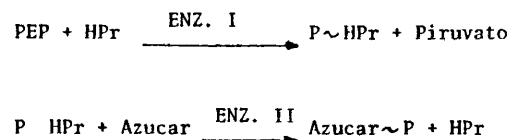
Las células vivas tienen la capacidad de acumular ciertos compuestos contra gradientes de concentración negativos. El ΔG^* de estos procesos de transporte es positivo, y por lo tanto la energía necesaria para este proceso tiene que suministrarse. Esto es, el transporte de una molécula contra un gradiente de concentración negativo tiene que estar acoplado de alguna manera a una reacción exergónica para que el ΔG^* total de la reacción sea cero o negativo. Los mecanismos moleculares involucrados en este acoplamiento de energía, tanto como los mecanismos de transporte en sí mismos, se están investigando ahora intensivamente.

La mayor parte de los sistemas de transporte están mediados por transportadores específicos a nivel de membrana que se comportan de manera enzimática. El término "permeasa" se usa a menudo para definir dichos transportadores. Si el sistema de transporte simplemente equilibra la concentración interna y externa de sustrato, el proceso se conoce como difusión facilitada. Si el sistema de transporte promueve una acumulación del sustrato contra un gradiente de concentración negativo, el proceso se llama transporte activo y tiene que estar acoplado a un sistema donador de energía.

Las células procariotas poseen fundamentalmente tres sistemas para el transporte activo de azúcares: el sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PEP-PTS) el promovido por la fuerza de la carga de los protones (PMF) y el sistema constituido por una permeasa ATP-dependiente (Roseman, 1969; Saier, 1977;

Dills et al., 1980).

El sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (sistema PEP-PTS) ha sido descrito por Roseman y colaboradores (Kundig, Gosh, Roseman, 1964; Kundig et al. 1966; Simone et al., 1977; Roseman, 1969) y puede ser esquematizado como sigue:



La enzima I cataliza el transporte del fosfato, del fosfoenolpiruvato (PEP) a un residuo de histidina presente en una proteína pequeña, HPr. La enzima II cataliza el transporte subsiguiente del fosfato, de P~HPr a un azúcar receptor. Parecer ser que hay una familia de moléculas de la enzima II con especificidad para diferentes azúcares o grupos de azúcares. El sistema PEP-PTS ofrece dos ventajas fisiológicamente importantes para los microorganismos que llevan a cabo la glicolisis anaeróbica. Primero, el sistema provee una fuerte unión entre el transporte del azúcar y la primera fase de su metabolismo; segundo, bajo condiciones en las que el suministro de energía es limitado, el sistema permite conservar el ATP ya que el azúcar es simultáneamente transportado y fosforilado con lo que puede entrar en procesos anabólicos y catabólicos directamente (Roseman, 1969; Saier, 1977; Dill et al., 1980).

En E.coli el grado de energización de la membrana regula la actividad del sistema PEP-PTS (Rhoads y Epstein, 1977). La incorporación de azúcares por este sistema suprime la incorporación de otros azúcares que no sean PEP-PTS, bien directamente, por exclusión del azúcar (Saier, 1977), o bien indirectamente, por represión catabólica (Peterkofsky y Gardar, 1975).

El sistema de transporte promovido por la fuerza de la carga de los protones (PMF), se basa en el potencial electroquímico generado por los iones hidrógeno. (Maloney y Wilson, 1975). La hipótesis quimiosmótica postula que el movimiento de los electrones en los sistemas de transferencia de electrones unidos a la membrana da lugar a la generación de un potencial eléctrico ($\Delta\psi$, interior negativo) y a un gradiente de pH (ΔpH , interior alcalino), que unidos forman una fuerza motriz para el transporte activo de los solutos a través de la membrana citoplasmática (Mitchell, 1966, 1973, 1976; Kaback, 1976; Konings y Boonstra, 1977; Konings, 1977).

En las células completas y en los fragmentos de membrana de E.coli, la fuerza motriz PMF es generada por el movimiento de los electrones de la cadena respiratoria (Collings y Hamilton, 1976; Padan et al., 1976; Ramos y Kaback, 1977).

En las células anaeróbicas, de la hidrólisis del ATP por la ATPasa $\text{Ca}^{++}\text{yMg}^{++}$ - dependiente unida a la membrana, también da lugar a la translocación de los iones hidrógeno (H^+) a través de la membrana celular, generando consi- ”

guientemente una fuerza motriz PMF. Ya que los iones hidrogeno pasan del interior al exterior de la celula, la actividad de la ATPasa genera un gradiente de pH a traves de la membrana (interior alcalino). Puesto que los iones cargados positivamente se mueven del interior al exterior de la celula tambien se establece un potencial electrico de membrana (interior negativo). Asi pues, la energia metabolica disipada por la hidrolisis del ATP se conserva como una fuerza PMF, una diferencia en el potencial electroquimico de los iones hidrogeno a traves de la membrana celular. Esta fuerza PMF puede utilizarse entonces para llevar a cabo una variedad de reacciones que dependen del suministro de energia (Maloney y Wilson, 1975; Boonstra 1978).

El sistema compuesto por una permeasa ATP-dependiente, depende directamente de este donador de energia para mediar el transporte de azucares. La energia de hidrolisis del ATP se acopla a la energia de transporte del azucar para hacer el ΔG total de la reaccion cero o negativo. La energia exergonica de la hidrolisis del ATP se usa solamente para mediar el transporte. Durante el paso del sustrato a traves de la membrana, aquel no se fosforiliza (Slee y Tanzer, 1979).

3. Determinacion del Donador de Energia en los Sistemas de Transporte Activos

Para determinar la naturaleza del compuesto quimico capaz de energizar un sistema enzimatico de transporte activo nos tenemos que basar en

experimentos que eliminan estos donadores de energia del metabolismo celular mediante el uso juicioso de inhibidores especificos. De esta manera se puede observar el efecto que su eliminacion ejerce en el transporte de determinados sustratos.

El sistema de transporte dependiente del ATP se puede determinar especificamente mediante el empleo de inhibidores de la sintesis del ATP o por la sensibilidad de este sistema al shock osmotico, una propiedad caracteristica de este sistema (Roseman, 1969; Rhoads y Epstein, 1977; Ferenci et.al., 1977).

La fuerza motriz PMF y por lo tanto el estado de energizacion de la membrana, se puede abolir con inhibidores metabolicos de dos clases: con inhibidores de la enzima ATPasa unida a la membrana entre los que se incluyen la N-N'-diciclohexilcarbodiimida (BCCD) y la clorhexidina o con compuestos conductores de protones (desacopladores) como la Tetraclorosalicililida (TCS la Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), el 2-4 dinitrofenol (DNP) y los antibioticos nigericina y monensina (Harold et.al., 1970). Los desacopladores disipan el gradiente de protones acelerando la difusion de protones de regreso hacia el interior de la celula. La BCCD y otros inhibidores de la ATPasa impiden el establecimiento del gradiente. Los desacopladores no parecen inhibir ni la glicolisis ni la sintesis de ATP, si bien los inhibidores de la enzima ATPasa alteran ligeramente la glicolisis (Galeotti et.al., 1968; Harold y Baarda, 1968; Harold y Pavlova, 1969; Harold, 1977).

La actividad fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS) se puede determinar espectrofotometricamente (Slee y Tanzer, 1979) o confirmando el transporte y la fosforilizacion de la α -metil-D-glucosa (α MG) un analogo no metabolizable de la D-glucosa y un sustrato caracteristico de los sistemas PEP-PTS (Kundig, 1971). A diferencia de la 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG) en las bacterias anaerobicas y en las anaerobicas facultativas la α MG no sirve de sustrato de los sistemas de transporte activo que estan mediados por el ATP (Hodson y Azam, 1979).

Usando esta aproximacion, se ha determinado en algunos sustratos la relacion entre la energizacion y el mecanismo molecular de transporte. Aunque la mayor parte del trabajo se ha realizado con E. coli, se dispone ya de alguna informacion en especies anaerobicas como Streptococcus y Clostridium (Slee, 1979; Thaver et.al., 1977)

En las celulas de C. pasterianum la incorporacion de galactosa y gluconato via sistemas de transporte inducibles esta energizada por la accion de una ATPasa (Booth y Morris, 1975). El transporte de galactosa y gluconato en estas celulas se inhibio por la accion de dos desacopladores y un inhibidor de la enzima ATPasa, en contraste con el transporte de la glucosa y de la fructosa que no se inhibio por estar mediado por el sistema PEP-PTS (Booth y Morris, 1975; Hugo y Gotschalk, 1974).

III. EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

C. thermocellum es un microorganismo anaerobico, termofilico y celulolitico y su utilidad esta teoricamente basada en su capacidad de producir etanol por la fermentacion directa de los sustratos celulosicos complejos.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar cuantitativamente la capacidad de las diferentes cepas de C. thermocellum de producir etanol y enzimas extracelulares con capacidad celulolitica. Pocos son los trabajos llevados a cabo con los sistemas extracelulares celuloliticos de las bacterias anaerobicas. La inducibilidad o constitutividad del sistema enzimatico celulolitico, su inhibicion o represion por los azucares solubles simples y la especificidad de los sustratos, son temas a estudiar. La celobiosa fosforilasa y la β -glucosidasa son dos enzimas con actividades hidroliticas especificas frente a la celobiosa y las celodextrinas. Estas enzimas estan asociadas con las celulas y no se liberan en el medio de cultivo. Su implicacion en la hidrolisis y en el metabolismo de la celobiosa no se conocen suficientemente.

Cuando C. thermocellum crece en sustratos organicos complejos, como consecuencia de su actividad celulolitica aparecen varios azucares solubles que se acumulan en concentraciones variables en el medio de cultivo (Wang et.al., 1976-1980). Existe la posibilidad de que estos azucares solubles se acumulan al no poder ser transportados y/o utilizados por aquellas celulas o porque estan sometidos a unos mecanismos de control de incorporacion muy rigurosos. Son pocos los trabajos que se han hecho

acerca de los mecanismos reguladores de la utilización de azúcares por

microorganismos que viven en sistemas orgánicos tan complejos y los resultados obtenidos pueden extrapolarse a otros microorganismos que viven en nichos ecológicos similares. El estudio de los mecanismos de transporte de azúcares, su utilización y posible regulación en C. thermocellum ha sido otro de los objetivos de este trabajo.

IV. MATERIALES Y METODOS

A. Microorganismo y Medios de Cultivo

1. Microorganismo

Las cepas de C. thermocellum disponibles al comienzo de esta investigacion fueron:

C. thermocellum, cepas Q1, N1 y H1: obtenidas por J.G. Zeikus de la Universidad de Wisconsin (U.S.A.).

C. thermocellum, cepa LQ8: originalmente aislada por L.Y. Quinn, Iowa State University, Ames, Iowa. (U.S.A.).

C. thermocellum, cepa TET: no bien descrita, obtenida por P.A. Tetrault en 1930.

C. thermocellum, cepas 157 y 651: aisladas por R.H. McBee en 1948.

C. thermocellum, cepa ATCC-27405: depositada en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (U.S.A.).

Las cepas LQ8, Q1, N1 y H1 nos fueron remitidas por el Dr. J.G. Zeikus. Departamento de Bacteriologia, Universidad de Wisconsin (EE.UU). Las cepas 157, 651 y TET nos fueron remitidas por el Dr. J.K. Alexander. Departamento de Quimica Biologica, Hahneman Medical College, Philadelphia, Pennsylvania (EE.UU).

2. Medios de Cultivos

El medio de cultivo basicamente utilizado para el crecimiento de C. thermocellum, fue el CM-4. Su composicion se indica en la Tabla II. Como sustratos energeticos se usaron Celobiosa, D-Xilosa y Xilano (Sigma Chemical Co.), D- glucosa (J.T. Baker Chemical Co.) y Celulosa "Solka Floc"

(madera de abeto molida y deslignificada, vendida por Brown Co., Berlin, New Hampshire, U.S.A.). Tambien se utilizo un medio minimo de cultivo, definido en vitaminas y sales, cuya composicion aparece en la Tabla III y que es perfectamente capaz de soportar el crecimiento de este microorganismo.

B. Metodos de Cultivo Anaerobicos

1. Cultivo en Tubos

La tecnica utilizada fue la de los cultivos anaerobicos de Hungate, (1969). Se emplearon los tubos de Hungate (9 x 160mm) con 10 ml de medio, esterilizados en autoclave. Estando el medio liquido todavia caliente, a los tubos se les inyecto N_2 esteril para desplazar el oxigeno y crear condiciones anaerobicas.

2. Cultivo en Matraces

Se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 500 ml, que contenian 250 ml del medio CM-4. Los matraces se adaptaron para su empleo en condiciones anaerobicas, de la forma descrita por Daniels et.al. (1975).

3. Placas de Agar

Las diluciones se hicieron en agua de peptona al 1% y pH 7,2, distribuyendose 0.1 ml de cada dilucion por la superficie de cada placa. Las placas se colocaron en una jarra anaerobica con un dispositivo generador de hidrogeno y dioxido de carbono ("Gaspak") y se incubaron a 60°C durante 4 dias.

TABLA II

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO CM-4

KH_2PO_4	1.5	g/l
K_2HPO_4	2.9	"
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.3	"
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.75	"
NaCl	1	"
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0132	"
Tioglicolato sodico	0.5	"
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.25	mg/ml
Solucion de Resazurina al 1%	0.20	ml/l
Extracto de Levadura	10	g/l
pH	7.2	

A este medio basico se a adio la celulosa u otros azucares
a una concentracion final de 6g/l.

TABLA III

COMPOSICION DEL MEDIO MINIMO* DE CULTIVO

(a) 900ml de H₂O destilada anadir:

KH ₂ PO ₄	1.5	gms
K ₂ HPO ₄	2.9	"
Urea	2.14	"
Cisteina.HCl	1	"
MOPS	10	"
Citrato Sodico	3	"
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.25	"
Solucion de Resazurina al 1%	0.20	ml
pH	7.4	

(b) 100ml de H₂O destilada anadir:

MgCl ₂ .6H ₂ O	1	gms
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.15	"
Glucosa o Celobiosa	6	"

Calentar para disolver y una vez frio anadir:

Vitamina B12 (1mg/ml solucion)	0.1	ml
Piridoxamina (20mg/ml solucion)	0.1	"
PABA (4 mg/ml solucion)	0.1	"
Biotina (0.2 mg/ml solucion)	1	"

Esterilizar la solucion (a) en autoclave

Esterilizar la solucion (b) por filtracion (0.45 µm Millipore Co.)

Guardar la solucion (b) en la obscuridad

A tubos de Hungate con 9ml de solucion (a), anadir 1ml de solucion (b).

* A.L. Demain, Research Group, M.I.T. (U.S.A.). Comunicacion personal.

C. Crecimiento del Microorganismo

Los cultivos "stock" de C. thermocellum se mantuvieron en refrigeración a 4°C en el medio líquido CM-4 y con celulosa Solka Floc como única fuente de carbono; su viabilidad fue de hasta 4 meses. Después de transferir estos cultivos tres veces a tubos que contenían CM4-celobiosa se sembraron los tubos o erlenmeyers que contenían el mismo medio CM-4 y cualquier otro azúcar. La temperatura de crecimiento fue siempre de 60°C. El crecimiento se midió por los cambios en la densidad óptica de los medios líquidos a 660 nm en un espectrofotómetro Turner 330. Cuando el sustrato era insoluble (celulosa o xilano) el líquido de fermentación se agitaba, se dejaba sedimentar por 30 minutos y entonces se leía la densidad óptica.

D. Concentración de Masa Celular

1. Turbidez del Cultivo

Para obtener la relación entre las unidades de densidad óptica y la concentración de la masa celular (peso celular seco en g/l), se filtraron volúmenes conocidos de un cultivo en diferentes fases del crecimiento a través de filtros de 0.45 µm (Millipore Co.) previamente pesados. En estas condiciones los filtros que ahora contienen las células, se secan a 80°C durante una hora en una cámara de aire seco, y una vez secos, se pesan de nuevo. La Figura 2 muestra la gráfica patrón que relaciona las unidades de densidad óptica a 660 nm, con el peso celular seco en g/l.

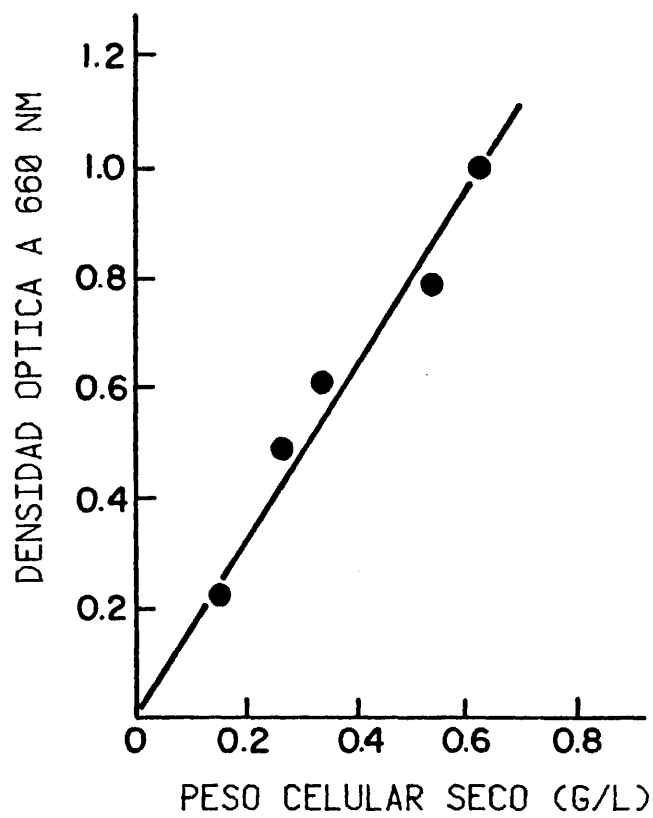


Figura 2: Curva estandar para Determinar el Valor Peso Celular Seco de C. thermocellum ATCC-27405.

E. Determinacion de la Proteina

1. Metodo de Lowry

El contenido proteico de las celulas enteras y de los extractos libres de celulas se determino de acuerdo con el metodo de Lowry (Lowry et.al., 1951). El incremento en la absorbancia de las soluciones en funcion de la concentracion de proteina se determino a 660 nm en un espectrofotometro Gilford Modelo 240. Como proteina estandar o modelo se uso la Albumina Bovina (BSA) fraccion V (de Cohen). La Figura 3 representa la curva estandar que relaciona las unidades de densidad optica a 660 nm, con la concentracion de proteina en $\mu\text{g/ml}$.

El contenido proteico de las celulas enteras fue aproximadamente el 60% del valor obtenido como peso celular seco.

2. Metodo de Bio-Rad

El contenido proteico de los extractos enzimaticos obtenidos por precipitacion de los liquidos sobrenadantes con etanol, se determino por este metodo debido a la conocida interferencia de los azucars reductores con el metodo de Lowry.

El metodo de Bio-Rad esta basado en el cambio de color de un colorante en respuesta a las diferentes concentraciones de proteina (Bradford, 1976). 0.2 ml de la muestra y 0.2 ml del blanco (buffer citrato, pH 4.8) se pipetearon en tubos diferentes. Despues de anadir 5ml del reactivo de color a los tubos, el incremento de la absorbancia se leyo a 595 nm. La concentracion de la proteina se obtuvo a partir de una curva estandar (Bio-Rad Lab. Technical Bulletin 1051).

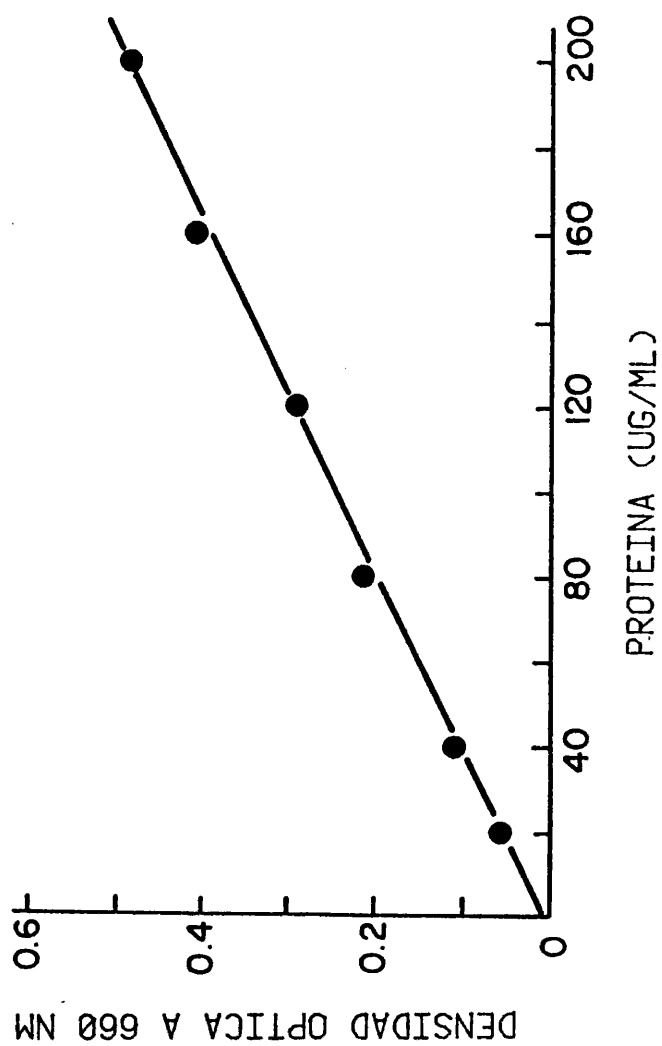


Figura 3: Curva Estandar para la Determinacion de la Proteina por el Metodo de Lowry.

F. Determinacion de Azucares

1. Azucares Reductores Totales

La concentracion de los azucares reductores solubles presentes en los medios de cultivo, se determino por el metodo colorimetrico del acido dinitrosalicilico descrito por Miller (1959). El medio de cultivo se centrifugo a 20,000 x g durante 10 minutos para eliminar las celulas.

A 1 ml del liquido sobrenadante, diluido en el buffer de citrato sodico (0.05 M, pH 4.8), se le anadieron 3 ml del reactivo del acido dinitrosalicilico (DNS). Los tubos se calentaron 5 minutos en un baño de agua hirviendo y posteriormente se enfriaron a la temperatura ambiente. El incremento en absorbancia de los tubos se midio a 550 nm en un espectrofotometro Gilford Modelo 240 frente a una solucion de DNS como blanco. La composicion del reactivo DNS es:

DNS (J.T. Baker Co.)	1.0% en peso
Fenol	0.2% "
Hidroxido Sodico	1.0% "
Tartrato de Sodico Potasico	20.0% "
Sulfito Sodico	0.5% "
Agua Destilada	100 ml

La Figura 4 muestra la curva estandar que relaciona las unidades de densidad optica con las diferentes concentraciones del azucar. Como azucares patron se emplearon D-glucosa y celobiosa.

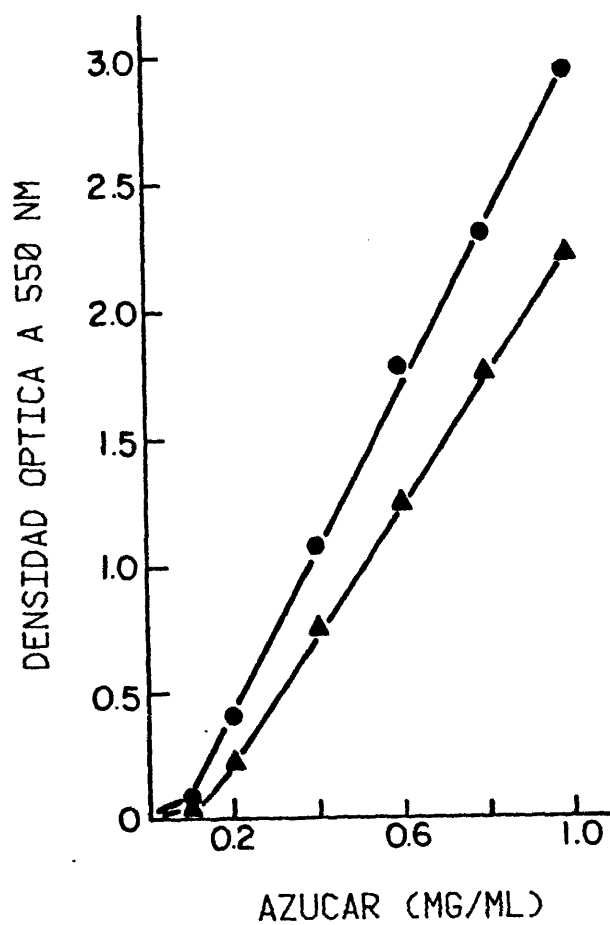


Figura 4: Curva Estandar para la Determinacion de Azucares Reductores
(●) D-glucosa y (▲) Celobiosa son los Azucares Standar

2. Determinacion de la D-glucosa

La concentracion de D-glucosa en el medio de cultivo se determino por la reaccion colorimetrica de la oxidacion de la glucosa con la enzima glucosa oxidasa (Sigma Chemical Co., Diagnostic Kit No. 510).

El sobrenadante del medio de cultivo carente de las celulas se diluyo en el buffer de citrato sodico (0.05M, pH 4.8) y un volumen determinado de esta solucion se puso en contacto con una concentracion determinada de la enzima glucosa oxidasa. En incremento de la densidad optica de los tubos se leyo a 450 nm y las concentraciones de la glucosa se obtuvieron a partir de curvas estandar de la glucosa disuelta en el medio CM-4. La presencia de celobiosa junto con glucosa en el mismo liquido sobrenadante no interfirio con los resultados obtenidos.

3. Determinacion de la Celobiosa

La concentracion de celobiosa en el medio de cultivo se determino como la diferencia entre la concentracion de los azucares reductores totales y la concentracion de la glucosa.

4. Cromatografia en Papel

La identificacion cualitativa de los azucares reductores solubles, acumulados en el medio de cultivo se llevo a cabo por cromatografia ascendente en papel de filtro Whatman n°1. El solvente fue n-butanol: acido acetico: Agua (4:2:1) y el colorante fue el ftalato de anilina al 1% (Partridge, 1949). Despues de pulverizado, el cromatograma se calentó a 105°C durante 5 minutos para desarrollar el color.

G. Análisis de los Productos de la Fermentación

1. Etanol

La concentración del etanol en los medios de cultivo se determinó por cromatografía en fase gaseosa. El cromatógrafo utilizado fue el Hewlett-Packard, Modelo 5839-A (Avondale, PA, U.S.A.) equipado con un Terminal Hewlett-Packard, Modelo 18850-A para la cuantificación directa de los productos obtenidos. Los medios de cultivo se centrifugaron primero a 20,000 x g durante 10 minutos para eliminar las células y entonces 0,5 ml de este sobrenadante libre de células se llevaron a viales que contenían 0.5 ml de una solución acuosa de ClH al 20%(V/V) con 2g/l de isopropanol como estándar interno. Tres microlitros de la muestra acidificada se pasaron por una columna de Teflon (1/8" x 5') rellena de Chromosorb 101 (John Manville, Denver, CO., U.S.A.). Las condiciones de cromatografía fueron: temperatura de la columna, 120°C, temperatura en el inyector, 200°C, temperatura en el detector, 250°C y como gas transportador helio a un flujo de 60 ml/min.

2. Ácido Acético

Su concentración en el medio de cultivo se determinó también por cromatografía en fase gaseosa utilizando las mismas muestras y equipo que para la determinación del etanol. Fue necesario acidificar la muestra a un pH menor de 2 para asegurar la presencia de todo el ácido acético en la forma ácida (Carlsson, 1973). Tres microlitros de la muestra acidificada

se inyectaron en una columna de Teflon (1/8" x 8') rellena de Chromosorb 101. Las condiciones del cromatografo fueron: temperatura de la columna 180°C, temperatura en el inyector, 200°C, temperatura en el detector, 250°C y helio como el gas transportador a un flujo de 60 ml/min.

3. Acido Lactico

El contenido en acido lactico del medio de cultivo se determino siguiendo las instrucciones del Diagnostic Kit No. 826-UV de la Sigma Chemical Co. (U.S.A.), con algunas modificaciones. La mezcla reaccionante estaba formada por 4 ml del buffer de glicina, 8ml de agua destilada y 0.2 ml de la enzima lactico dehidrogenasa disuelta en un vial que contenia 10mg de NAD⁺. 0,2 ml de los sobrenadantes libres de celulas se disolvieron en 1ml de agua destilada. La concentracion del acido lactico se determino en los tubos que contenian 0,8ml de la mezcla reaccionante con 0,4 ml de los sobrenadantes disueltos en el agua destilada. El incremento en absorbancia de los tubos se leyó a 340 nm. La Figura 5 muestra la curva estandar que relaciona las unidades de densidad optica a 340 nm con las concentraciones de acido lactico en µg/ml.

H. Actividades Enzimaticas Extracelulares

1. Actividad CMCasa

Este metodo permite medir cuantitativamente la concentracion de los azucares reductores libres, liberados a partir de la Carboximetilcelulosa (CMC, Sigma Chemical Co. U.S.A.), cuando esta se incuba con las proteinas extracelulares presentes en los liquidos sobrenadantes.

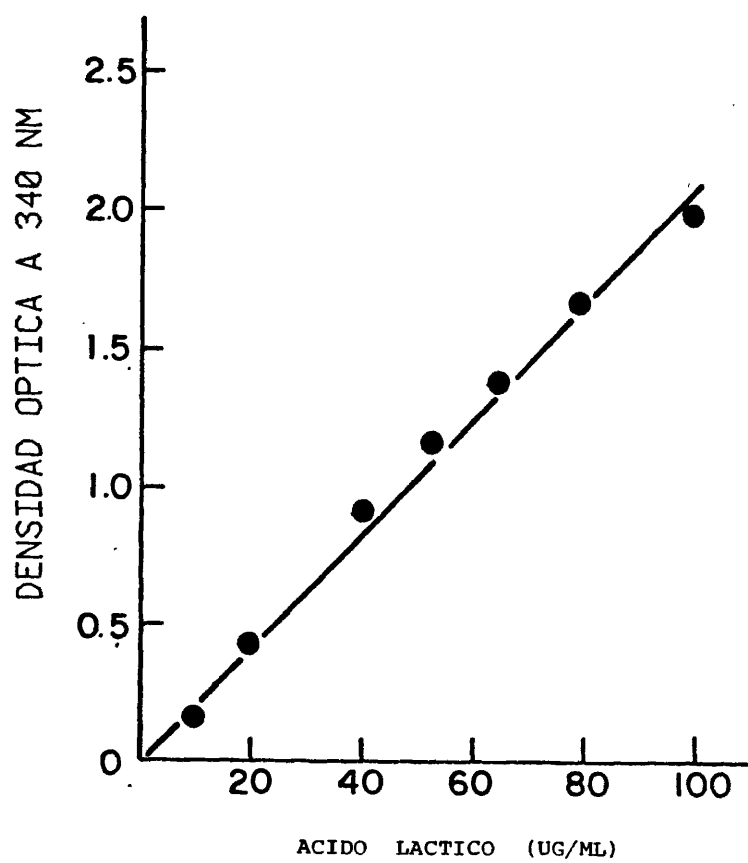


Figura 5: Curva Estandar para la Determinacion del Acido Lactico.

Los medios de cultivo se centrifugaron a 20,000 x g por 10 min. para eliminar las células y las proteínas extracelulares presentes en estos sobrenadantes se concentraron por precipitación con el etanol, presente en la reacción a una concentración final del 40% (V/V). Los sobrenadantes con el etanol se mantuvieron en un baño de hielo durante unas 12 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron, el líquido sobrenadante se eliminó y el residuo sólido se resuspendió en un buffer 0.05M de citrato sódico a pH 7,2.

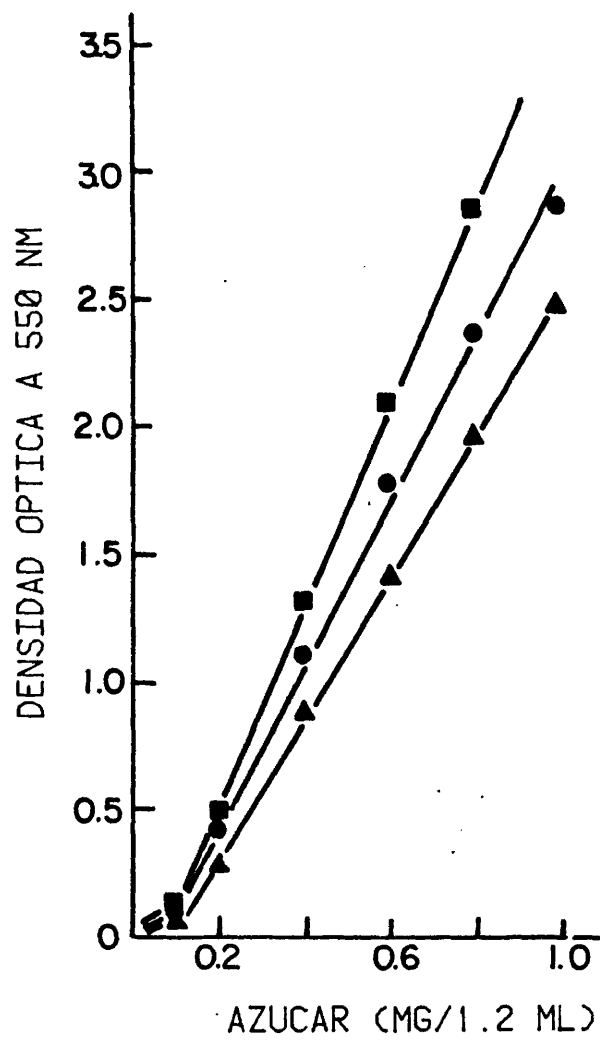
Finalmente, 0.2 ml de estas soluciones concentradas de proteína, se llevaron por duplicado a dos tubos que contenían cada uno 1 ml de una solución de CMC al 2% en buffer de citrato sódico a pH 4.8. Dos tubos sin CMC y otros dos tubos con CMC, pero sin extracto enzimático, se incluyeron siempre como controles en cada determinación.

El sustrato con los extractos enzimáticos se incubó durante una hora a 60°C y la reacción se terminó por la adición de 3ml del reactivo DNS a cada tubo. Los tubos se calentaron 5 minutos en un baño de agua hirviendo y se dejaron enfriar a la temperatura ambiente. Una vez fríos, el incremento de su densidad óptica se midió a 550 nm en un espectrofotómetro Gilford Modelo 240 frente a una solución del reactivo DNS como blanco.

La Figura 6 muestra la curva estándar que relaciona las unidades de densidad óptica a 550 nm con las concentraciones variables de azúcares, en un volumen total de 1,2 ml. D-glucosa, celobiosa y D-xilosa se utilizan como azúcares estándar. La actividad CMCasa se expresó en mg de Glucosa liberada/ml de líquido sobrenadante-Hora.

Figura 6: Curva Estandar para la Determinacion de Actividades Enzimaticas Extracelulares. Relaciona Unidades de Densidad Optica con Concentraciones de Azucar en un Volumen Total de 1.2 ml.

Los Azucres Estandar son: (■) D-xilosa,
(●) D-glucosa y (▲) Celobiosa.



2. Actividad FPasa

Este metodo permite medir cuantitativamente la concentracion de los azucares reductores libres, liberados a partir del papel de filtro Whatman n°1 (Whatman Co., U.S.A.), cuando este se incuba con las proteinas extracelulares presentes en los liquidos sobrenadantes de estos microorganismos. 0.2 ml de los extractos enzimaticos obtenidos por precipitacion con etanol (seccion H-1) se analizaron por duplicado en tubos que contenian cada uno 1 ml de una solucion 0.05M de buffer citrato sodico a pH 4.8 y una tira (1x3 cm) del papel de filtro. La incubacion del papel con los extractos enzimaticos tuvo lugar durante una hora a 60°C y la reaccion se termino por la adiccion de 3 ml del reactivo DNS a cada tubo. Los tubos se calentaron 5 minutos en un baño de agua hirviendo y una vez frios su densidad optica se midio a 550 nm. Como controles se incluian siempre en cada determinacion dos tubos sin el papel y otros dos tubos con la tira de papel pero sin el extracto enzimatico.

La actividad FPasa se expreso en mg de Glucosa liberada/ml de liquido sobrenadante-Hora y la Figura 6 sirve de referencia estandar.

3. Actividad Xilanasa

Esta tecnica permite medir cuantitativamente la concentracion de los azucares reductores libres, liberados a partir del xilano (Sigma Chemical Co. U.S.A.), como sustrato. 0.2 ml del extracto obtenido como en la seccion H-1 se llevaron por duplicado a tubos que contenian 3 ml

de una solución del xilano al 2% en buffer de citrato sódico 0.05M y pH 4.8. En cada determinación se utilizó un tubo control que no contenía xilano y otro que tenía xilano, pero no extracto enzimático. Todos los tubos se incubaron una hora a 60°C. Después de la incubación, los tubos que contenían xilano se centrifugaron a 20,000 x 9 x 10 min. para eliminar el xilano insoluble y 1.2 ml de los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos para analizar por el método del DNS los azúcares reductores presentes.

La actividad xilanasa se expresó en mg de xilosa liberada/ml de líquido sobrenadante-Hora.

I. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Basicamente, la técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970). La concentración de poliacrilamida en los geles fue del 9%. La electroforesis natural se diferenciaba de la del SDS (Dodecyl Sulfato de Sodio al 10%) en que en la electroforesis natural, los geles y la solución buffer carecían de SDS y de 2-mercaptoetanol. Los geles se tiñeron por el Azul de Coomassie al 0,25% (W/V) en una solución acuosa de metanol al 50% (V/V) y ácido acético al 7% (V/V). Como muestra se usaron 10 microlitros de los extractos proteicos a una concentración de 0,23 mg/ml. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 40V durante unas once horas.

J. Determinacion de las Actividades Enzimaticas Posiblemente Involucradas en el Transporte de Azucares

1. Preparacion de los Extractos Libres de Celulas

Al final del crecimiento exponencial se recogieron las celulas por centrifugacion (20,000 x g durante 10 minutos); se lavaron por dos veces en el buffer de fosfato sodico-potasico (50 mM a pH 7,2) con 5 mM Cl_2Mg y se resuspendieron en el mismo buffer hasta una concentracion final de 17-20 mg peso celular seco/ml. Estas celulas se rompieron en un agitador Vortex, por agitacion vigorosa en presencia de perlas de cristal (Sigma Chemical Co., Type I, 75-100 microns) siendo el porcentaje final de celulas rotas de alrededor del 40-50%. Los extractos libres de celulas se obtuvieron centrifugando el extracto anterior a 14,000 x g durante 20 minutos. El contenido proteico del sobrenadante se midio por el metodo de Lowry.

2. Actividad Glucoquinasa

Se estimo mediante un metodo que es una ligera modificacion de un procedimiento ya descrito (Conrad, 1977). La composicion y la concentracion de los componentes de la mezcla reaccionante se muestran en la Tabla IV. La mezcla reaccionante y el extracto libre de celulas se pre-incubaron a 50°C durante 4 minutos, antes de que comenzase la reaccion al adicionar el sustrato la glucosa. Inmediatamente despues de la adicion de glucosa, se midio la reduccion del NADP a 340 nm y 50°C en un

TABLA IV

MEZCLA REACCIONANTE PARA ESTIMAR LA ACTIVIDAD GLUCOQUINASA

	<u>3ml</u>	<u>Conc./ml</u>
Na-K-P buffer pH7.2, 100mM	2.06 ml	68 mM
MgCl ₂ , 75mM	0.20 "	5 "
ATP, 300mM	0.10 "	10 "
NADP, 3mM	0.20 "	0.2 "
G6P-dh	0.040 ml	1.2 U
D-glucosa, 200mM	0.30 "	20 mM
Extracto Libre de Celulas	0.10 "	

Na-K-P = buffer de Fosfato Sodico-Potasico

ATP = Adenosin-5'-Trifosfato

NADP = β Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato

G6P-dh = Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa, Tipo IX
(Sigma Chemical Co.)

espectrofotometro Beckman Modelo 25 equipado con un registrador continuo. Los controles experimentales se llevaron a cabo omitiendo los sustratos o el extracto libre de celulas de la mezcla reaccionante. La actividad especifica glucoquinasa se expreso en micromoles de NADPH producidos / minuto x mg de proteina.

3. Actividad Celobiosa Fosforilasa

Basicamente, se siguio el metodo de Alexander (1968), pero con muchas modificaciones. La composicion y la concentracion de los componentes de la mezcla reaccionante se indica en la Tabla V. La mezcla reaccionante con el extracto libre de celulas se preincubo a 50°C durante 4 minutos antes de que el sustrato, la celobiosa, se añadiese a la reaccion. Una vez añadido el sustrato la reduccion del NADP se midio a 340 nm y 50°C. Los controles experimentales se llevaron a cabo omitiendo los sustratos o el extracto libre de celulas de la mezcla reaccionante. La actividad especifica celobiosa fosforilasa se expreso en micromoles de NADPH producidos/minuto x mg proteina.

4. Actividad β -Glucosidasa

La determinacion se hizo de acuerdo con Ait et al. (1979), pero excluyendo de la mezcla reaccionante el fosforo inorganico cuando asi se indique. La actividad β -glucosidasa se determino midiendo la liberacion del p-nitrofenol a partir del sustrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido

TABLA V

Mezcla Reaccionante para Estimar la Actividad Celobiosa Fosforilasa

			3ml	Conc./ml	
MG buffer pH6.0	100	mM	1.94 ml	64	mM
SO ₄ Mg.	300	"	0.10 "	10	"
EDTA	0.45	"	0.10 "	0.015	"
G-1-6-P,	0.367	mM	0.010 ml	1.22x10 ⁻³	mM
NADP,	4.5	"	0.20 "	0.3	"
Fosfoglucomutasa			0.012 "	10	µg
GGP-dh			0.040 "	1.2	U
Celobiosa,	200	mM	0.30 ml	20	mM
PO ₄ HNa ₂ ,	375	"	0.20 "	25	"
Extracto Libre de Celulas			0.10 ml		

MG = Acido 3-3-Dimetilglutarico con NaOH 0,2N

EDTA = Acido Etilendiamida Tetraacetico (sal disodica)

G-1-6-P = α-D-Glucosa-1, 6-difosfato, sal de Tetraciclohexilamonio

Una solución que contenía una cantidad adecuada del extracto libre de células, 4 mM de PNPG y 100 mM de buffer MG o 100 mM de Na-K-P buffer a pH 7,2 se incubó a 60°C. Durante los primeros 15 minutos de la reacción se tomaron fracciones de 1 ml las cuales se añadieron a 2 ml de una solución 1M de CO_3Na_2 . La concentración del p-nitrofenol presente en estas fracciones se midió a 400nm. Como control experimental se utilizó la misma mezcla, pero omitiendo el extracto libre de las células de la mezcla reaccionante. La actividad específica β -glucosidasa se expresó en micromoles de p-nitrofenol producido min. x mg de proteína.

5. Preparación de las Células Permeabilizadas

Casi al final de la fase de crecimiento exponencial se recogieron las células por centrifugación, se lavaron dos veces en el buffer del fosfato sodico-potasico (50mM a pH7.2) con Cl_2Mg 5mM y ditioneitol 1mM y finalmente se resuspendieron en el mismo buffer a una concentración de

2.56 mg peso celular seco/ml. Las células se permeabilizaron por agitación vigorosa durante 2min. en un agitador Vortex (con periodos intermitentes de enfriamiento en un baño de hielo) en presencia de una solución de tolueno: acetona 1:4 (V/V) a una concentración de 0.01 ml de esta solución por ml de suspensión celular (Slee y Tanzer, 1979).

6. Actividad Fosfoenolpiruvato-Fosfotransferasa (PEP-PTS)

Esta actividad puede ser determinada espectrofotométricamente (Slee y

y Tanzer, 1979). La composicion y la concentracion de los componentes de la mezcla reaccionante se muestran en la Tabla VI. La mezcla reaccionante con las celulas permeabilizadas se preincubo a 45°C durante 4 minutos antes de que se añadiese a la reaccion el sustrato, la glucosa. Una vez anadido el sustrato, la oxidacion del NADH se midio a 340nm y 45°C. Los controles experimentales se llevaron a cabo omitiendo los sustratos o el extracto libre de las celulas en la mezcla reaccionante. La actividad PEP-PTS se expreso en micromoles de NAD⁺ producidos/min. x mg proteina.

K. Determinacion de la Incorporacion del Azucar - (¹⁴C-U)

Casi al final de la fase de crecimiento exponencial se recogieron las celulas por centrifugacion, se lavaron dos veces en el buffer de fosfato sodico-potasico (50mM a pH 7.2) con Cl₂ Mg 5mM y finalmente se suspendieron en el mismo buffer a una concentracion 40 veces mayor que la original. Para cuantificar la incorporacion del azucar, 0.25 ml de esta suspension concentrada de celulas se transfirieron a tubos de Hungate (9 x 100mm) que contenian 4.5ml del buffer de fosfato sodico-potasico (50mM a pH 7.2) con SO₄Mg 5mM perfectamente esterilizados y con la solucion buffer en condiciones anaerobicas. Despues de acondicionar las celulas durante 8 minutos a 60°C, la incorporacion del azucar se inicio añadiendo 0,1 ml de una solucion de cloramfenicol (300 mg en 10ml de agua destilada esteril), 0.15 ml de glucosa no radioactiva a diversas concentraciones finales y un volumen de (¹⁴C-U)-D-glucosa (301-350 mCi/mmol, New

TABLA VI

Mezcla Reaccionante para Estimar la Actividad Fosfoenolpiruvato-
Fosfotransferasa (PEP-PTS)

		<u>3mℓ</u>	<u>Conc./mℓ</u>
Na-K-P buffer pH 7.2,	100 mM	1.79 mℓ	60 mM
Cl ₂ Mg,	75 mM	0.20 "	5 "
PEP,	150 mM	0.10 "	5 "
NAD,	3 mM	0.20 "	0.2 "
Lactato Dehidrogenasa		0.007 "	2.7 U
Glucosa,	50 mM	0.60 "	10 mM
Celulas Permeabilizadas		0.10	

PEP = Fosfoenolpiruvato, sal monopotasica
 NAD = β-Nicotinamida Adenina Dinucleotido
 Lactato Dehidrogenasa = L-Lactico Dehidrogenasa, Tipo XI
 (Sigma Chemical Co.)

England Nuclear Corporation, U.S.A.) suficiente para dar la misma actividad especifica en cada una de las diferentes concentraciones del azucar. A intervalos diferentes de tiempo se tomaron de los tubos alicuobas de 0,5 ml de esta suspension celular incubada a 60°C y se filtraron inmediatamente en filtros de Millipore (HA, 0.45 μ m). Los filtros se lavaron con 5 ml del buffer de fosfato sodico-potasico (50mM a pH 7.2) calentado a 60°C y finalmente se desecaron bajo una lampara. La radioactividad en los filtros se conto introduciendolos en viales que contenian 10ml del liquido de centelleo de Bray (New England Nuclear Co., U.S.A.) y mediante el contaje posterior de estos viales en un Espectrofotometro de Centelleo Liquido, Beckman LS-230. Las celulas muertas por la accion del calor (100°C-10 min.) y las celulas "no adaptadas a crecer en la glucosa" se utilizaron como los controles experimentales en todos los experimentos de incorporacion.

L. Determinacion de la Concentracion de Azucares Fosforilados en los Sobre-
nadantes de las Celulas Permeabilizadas, Incubadas con la D-Glucosa, α -MG o
2-DOG en Presencia del ATP, PEP o Ninguno de Ellos

Las celulas se premeabilizaron como se indico en la seccion J-5 y despues de 1/2 hora del tratamiento "descriptificador", 0.1 ml de la suspension de las celulas permeabilizadas se pusieron en contacto con la mezcla reaccionante cuya composicion se muestra en la Tabla VII. Las celulas permeabilizadas se incubaron con las mezclas reaccionantes durante 20 minutos a 60°C y despues de este tiempo

TABLA VII

Mezcla Reaccionante para la Determinacion de Azucares Fosforilados
en los Sobrenadantes de Celulas Permeabilizadas

	<u>0.5 ml</u>	<u>Conc./ml</u>
0.1 buffer MG con 10mM SO ₄ Mg. pH7.2	0.30 ml	60 mM
0.125 M ATP, PEP, ninguno	0.40 "	10 "
0.125 M D-Glucosa, αMG 0 2-DOG (0.482 μCi/μmol)	0.40 "	10 "
Suspension Celulas Permeabilizadas	0.10 "	
Agua Destilada	0.020 "	

La Glucosa, D-[¹⁴C-U] procede de New England Nuclear Corp. y tiene una
actividad especifica de 3.95 μCi/mmol

El Metil (α-D-[¹⁴C-U]gluco) piranosido (αMG) es de Amersham Co.
con una actividad especifica de
185 μCi/mmol

La 2-Desoxi-D-[¹⁴C-U] glucosa (2-DOG) es tambien de Amersham Co. con
una actividad especifica de 283 μCi/mmol.

los tubos se centrifugaron a $15,000 \times g$ 5 minutos para eliminar las células. Aliquotas de 0.050ml de estos sobrenadantes se filtraron con discos aniónicos de papel de filtro Whatman DE-81 (5 filtros, 2.5 cm de diámetro) permitiendo que el líquido se empapase en los filtros durante 2 minutos, antes de poner en funcionamiento la bomba de vacío. Los filtros se lavaron dos veces con agua destilada a 60°C y finalmente se introdujeron en viales que contenían 10ml del líquido de centelleo de Bray para ser contados en un Espectrofotómetro de Centelleo Líquido, Beckman LS-230 (Romano *et al.*, 1979; Hodson y Azam, 1979).

M. Fosforilación de la D-Glucosa en Células Permeabilizadas de *C. thermocellum*

Un volumen de 0.2 ml de células, permeabilizadas como se indicó en la sección J.5 y después de 1/2 hora de tratamiento "descriptificador", se pusieron en contacto con la mezcla reaccionante cuya composición se muestra en la Tabla IV. La mezcla reaccionante con ATP, PEP o ninguno de ellos se incubó 2 minutos a 42°C antes de añadir a la reacción el sustrato, la glucosa. Una vez añadido el sustrato, la reducción del NADP se midió a 340nm y 42°C . Los controles experimentales se llevaron a cabo omitiendo los sustratos o las células permeabilizadas de la mezcla reaccionante. La fosforilación de la glucosa se expresó en micromoles de NADPH producidos/min. \times mg de proteína.

N. Análisis Estadísticos

Algunos resultados experimentales se sometieron a un análisis estadístico por regresión multiparamétrica no-lineal. Este análisis está basado en el

algoritmo de Powell y la tecnica consiste en proponer una ecuacion cinetica general y de esta ecuacion obtener los valores de la K_m , V_{max} y K_i a partir de la curva que minimiza la suma de los cuadrados de la diferencia de los errores, para cada uno de los valores experimentales sometidos a analisis.

V. RESULTADOS

A. Evaluacion del C.thermocellum Como Productor de Etanol

Como primer paso para evaluar el potencial de C.thermocellum para producir etanol por fermentacion directa de los materiales celulosicos complejos todas las cepas de C.thermocellum disponibles hasta este momento se evaluaron por las características de su crecimiento en varios sustratos, producción de etanol y resistencia frente al etanol.

Es importante señalar que en la primera parte de este estudio el azúcar celobiosa se ha utilizado como el sustrato modelo, basandonos en hechos experimentalmente probados que demuestran que la celobiosa es el azúcar utilizado mayormente por este microorganismo cuando crece en los sustratos celulosicos y en que su concentración en el medio de cultivo es siempre lo suficientemente alta como para no limitar el crecimiento (Wang et al., 1976-1980). Al no utilizar como sustrato la celulosa, eliminamos las desventajas de trabajar con un sustrato insoluble en el que es muy difícil seguir el crecimiento del microorganismo por cambios en la densidad óptica del medio.

1. Crecimiento en Varios Sustratos

Estos resultados se obtuvieron creciendo los microorganismos en tubos de Hungate que contenían 10ml del medio líquido complejo CM-4 y 6g/l del azúcar especificado como fuente de carbono y energía.

La Tabla VIII muestra el crecimiento en celobiosa de todas las cepas de

C.thermocellum. Las cepas ATCC-27405, H1, LQ8 y N1 fueron las que en este sustrato crecieron con mayor rapidez y prolificidad, tanto en terminos de mayores concentraciones finales de celulas, como en tiempos de duplicacion menores.

Ya que las hemicelulosas constituyen una fraccion importante de los sustratos celulosicos complejos y tambien debido al confusionismo existente en la bibliografia sobre la utilizacion de azucares por este microorganismo, todas las cepas de C.thermocellum se evaluaron por su crecimiento en D-xilosa. Como indica la Tabla IX solamente las cepas H1, LQ8 y N1 fueron capaces de crecer en la D-xilosa. Ya que estas cepas habian sido descritas anteriormente como incapaces de crecer en pentosas o en glucosa, estos cultivos se analizaron de nuevo para determinar si estaban en realidad compuestos por una poblacion mixta de microorganismos.

Usando procedimientos normales de aislamiento, principalmente morfologia las colonias y capacidad de crecimiento en diferentes azucares, fue posible aislar tres nuevos microorganismos que se denominaron HG1, HG2 y HG3. El microorganismo HG1 se aislo del cultivo LQ8, el HG2 del N1 y el HG3 del H1. Estos tres microorganismos crecieron en xilano, xilosa, celobiosa y glucosa, pero no en celulosa Solka Flock.

La Tabla X muestra las caracteristicas de crecimiento en xilano de varias

TABLA VIII

Crecimiento de Varias Cepas de C. thermocellum en Celobiosa

<u>Cepa</u>	<u>D.O. a 660nm</u>		<u>Tiempo de Duplicacion</u> (Hrs)
	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>	
Q1	0.03	0.55	5.0
TET	0.03	0.60	3.0
157	0.03	0.66	3.0
651	0.03	0.14	-
ATCC-27405	0.03	0.71	2.7
H1	0.03	0.78	2.8
LQ8	0.03	0.76	3.0
N1	0.03	0.80	2.8

D.O. = Densidad Optica

TABLA IX
Crecimiento de Varias Cepas de C. thermocellum en D-xilosa

<u>Cepa</u>	<u>D.O. a 660 nm</u>		<u>Tiempo de Duplicacion</u> <u>(Hrs)</u>
	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>	
Q1	0.04	0.04	0
TET	0.04	0.04	0
157	0.04	0.04	0
ATCC-27405	0.04	0.04	0
H1	0.04	0.78	2.6
LQ8	0.04	0.64	2.9
N1	0.04	0.76	2.7

D.O. = Densidad Optica

TABLA X

Crecimiento de Varias Cepas de C. thermocellum y de los
Microorganismos HG en Xilano

<u>Cepa</u>	<u>D.O. a 660 nm</u>		<u>Tiempo de Duplicacion (Hrs)</u>
	<u>Inicial</u>	<u>Final</u>	
Q1	0.34	0.15	0
TET	0.34	0.15	0
157	0.34	0.15	0
ATCC-27405	0.34	0.15	0
LQ8	0.34	0.15	0
HG1	0.34	0.75	2.7
HG2	0.34	0.89	1.6
HG3	0.34	0.87	2.0

D.O. = Densidad Optica

cepas de C.thermocellum y de los microorganismos HG1, HG2 y HG3. Es interesante el hecho de que la densidad optica de los tubos inoculados con C.thermocellum decrecio en un 50%. Sin embargo, esta claro que estos microorganismos no pueden utilizar para crecer los productos de degradacion del xilano.

La Tabla XI muestra las características de crecimiento de los microorganismos del grup HG en la celobiosa y la D-xilosa. Los microorganismos HG1 y HG2 tienen características de crecimiento similares, pero el HG3 crece extremadamente mal en celobiosa.

2. Produccion de Etanol

El mejor sistema de determinar cual de las cepas de C.thermocellum es la mejor productora de etanol consiste en cuantificar su produccion de etanol utilizando la celobiosa como sustrato. En este estudio tambien se evaluaron los microorganismos del grupo HG. Ya que estos microorganismos son capaces de utilizar la fraccion hemicelulosa de los materiales celulosicos complejos, existe la posibilidad, de que algun dia puedan ser empleados en cultivos mixtos con el C. thermocellum.

La produccion de etanol es una propiedad ligada al crecimiento y como muestra la Tabla XII, del grupo de C.thermocellum la cepa ATCC-27405 fue la mejor productora de etanol, tanto en terminos de concentracion final maxima de etanol (0.48 g/l) como en maxima velocidad especifica de formacion (0.12 g/g celulas -hr). Los microorganismos del grup HG produjeron doble

TABLA XI

Crecimiento de los Microorganismos HG en D-xilosa y en Celobiosa

Cepa	Sustrato	D.O. a 660nm		Tiempo de Duplicacion (Hrs)
		Inicial	Final	
HG1	D-Xilosa	0.04	0.85	2.0
HG2	"	0.04	0.87	2.0
HG3	"	0.04	0.78	2.6
HG1	Celobiosa	0.03	1.0	2.2
HG2	"	0.03	1.0	2.6
HG3	"	0.03	ND	5.0

D.O. = Densidad Optica

ND = Sin Determinar

TABLA XII

Produccion de Etanol por Varias Cepas de *C. thermocellum* y de los Microorganismos HG a partir de Celobiosa

<u>Cepa</u>	<u>Etanol, Concentracion Maxima (g/l)</u>	<u>Produccion Especifica de Etanol (gETOH/g cell-hr)</u>
Q1	0.24	0.04
TET	0.24	0.06
157	0.34	0.10
ATCC-27405	0.48	0.12
HG1	0.90	0.46
HG2	0.78	0.36
HG3	0.84	0.40

cantidad de etanol (0.78-0.90 g/l) a velocidades específicas de formación mucho más rápidas (0.26 - 0.46 g/g células -hr). De hecho, los microorganismos HG son capaces de producir etanol a partir de xilano, de D-xilosa, y de D-glucosa (Tablas XIII, XIV y XV).

3. Toxicidad por Etanol

La concentración final de etanol en el medio de cultivo puede inhibir no solo el crecimiento sino limitar también la concentración final de etanol producido por estos microorganismos. En este experimento se investigó la acción inhibidora del etanol sobre el crecimiento en celobiosa de todos los microorganismos. Cada cepa se creció hasta la mitad de su fase de crecimiento exponencial en cuyo momento se añadieron al medio de cultivo concentraciones variables de etanol. El crecimiento del microorganismo se midió siguiendo el aumento de la densidad óptica del medio a 660nm y el % de inhibición se definió como:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

donde C_0 = D.O. final del cultivo no inhibido (control)

C = D.O. final de los cultivos inhibidos

La Tabla XVI muestra, que de los microorganismos del grupo C.thermocellum, la cepa ATCC-27405 es la más resistente a la inhibición por etanol aunque 10 g/l de etanol causaron una inhibición del crecimiento del 50%. En general

TABLA XIII

Produccion de Etanol por Microorganismos HG a Partir de Xilano

<u>Cepa</u>	<u>Etanol, Concentracion*</u> <u>Maxima (g/l)</u>	<u>Produccion Especifica de Etanol</u> <u>(gETOH/g celulas-hr)</u>
HG1	0.53	0.19
HG2	0.75	0.29
HG3	0.79	0.26

* La fermentacion se paro antes de que se alcanzase la concentracion final.

TABLA XIV

Produccion de Etanol por Microorganismos HG a Partir de
D-xilosa

<u>Cepa</u>	<u>Etanol, Concentracion Maxima (g/l)</u>	<u>Produccion Especifica de Etanol (gETOH/g celulas-hr)</u>
HG1	0.86	0.50
HG2	0.91	0.47
HG3	0.99	0.63

TABLA XV

Produccion de Etanol por Microorganismos HG a partir de Glucosa

<u>Cepa</u>	<u>Etanol, Concentracion Maxima (g/l)</u>	<u>Produccion Especifica de Etanol (gETOH/g celulas-hr)</u>
HG1	1.18	0.40
HG2	1.14	0.40
HG3	1.41	0.63

TABLA XVI

Toxicidad del Etanol para las Cepas de C. thermocellum y para los Microorganismos del Grupo HG

<u>Cepa</u>	<u>Concentracion de Etanol (g/l) Requerida para Inhibir el Crecimiento en un 50%</u>
Q1	9
TET	< 5
157	8
ATCC-27405	10
LQ8	2
HG1	8
HG2	25
HG3	15

<u>Cepa</u>	<u>% Inhibicion a 30 g/l</u>
Q1	100%
TET	100%
157	95%
ATCC-27405	100%
LQ8	100%
HG1	70%
HG2	55%
HG3	60%

los microorganismos del grupo HG son mas resistentes al etanol que las cepas de C. thermocellum. El microorganismo HG2 crecio incluso en presencia de 30 g. de etanol por litro.

B. Evaluacion de Dos Cepas de C. thermocellum y del Microorganismo HG2 por sus Actividades "Celulasa" y "Xilanasa"

La capacidad de estas cepas de degradar las fracciones celulosa y hemi-celulosa de los sustratos celulosicos complejos se determino cuantificando la presencia de azucares reductores libres cuando los extractos proteicos de los sobrenadantes de los medios de cultivo se incubaron en presencia de sustratos tan definidos como filtro de papel Whatman n°1 (Actividad FPasa), Carboximetil-celulosa (Actividad CMCasa) o Xilano (Actividad Xilanasa).

Para este estudio elegimos la cepa ATCC-27405 del grupo de C. thermocellum por ser la mejor productora de etanol. Del grup HG seleccionamos la cepa HG2 por su alta produccion de etanol a partir de xilano, xilosa y glucosa y por su gran resistencia a la intoxicacion por el etanol. Como control se utilizo la cepa LQ8 de C. thermocellum por ser esta la que actualmente estudian J.G. Zeikus

y su grupo, de la Universidad de Wisconsin (U.S.A.) y de la que ya se ha publicado alguna informacion sobre su capacidad de degradar la celulosa.

1. Capacidad de Degradar y Utilizar las Hemicelulosas

Cuando los tres microorganismos bajo estudio se inocularon en medios liquidos con xilano como unica fuente de carbono solo los tubos inoculados con el microorganismo HG2 acusaron un incremento en la densidad optica del medio indicando crecimiento celular, mientras que en los tubos inoculados con las cepas LQ8 y ATCC de C. thermocellum, se observo una disminucion de la densidad optica del medio, prueba de degradacion del xilano, pero no de crecimiento celular. Como la Tabla XVIII indica, los azucares reductores libres se acumularon en los medios de cultivo de las cepas de C. thermocellum pero no en los del microorganismo HG2. Este ultimo resultado fue confirmado por cromatografia en papel.

Seguidamente, se estudio el efecto de la fuente de carbono en la expresion de las actividades enzimaticas extracelulares del microorganismo HG2. Como se observa en la Tabla XVIII todas las actividades enzimaticas, aunque bajas, estan presentes en cada una de las fuentes de carbono analizadas. Sin embargo, esta claro que las actividades CMCase y Xilanasa son mayores cuando el microorganismo crece en xilano que cuando lo hace en celobiosa, glucosa o xilosa.

Finalmente, la Tabla XIX muestra el desarrollo de las actividades enzimaticas en funcion del tiempo cuando el microorganismo HG2 crece en xilano o xilosa. „

TABLA XVII

Crecimiento y Acumulacion de Azucares Reductores Solubles en dos Cepas de C. thermocellum y en el Microorganismo HG2 Cuando Crecen en Xilano

a) Valores de densidad optica a 660 nm:

<u>Cepa</u>	<u>0 Hrs</u>	<u>15 Hrs</u>	<u>25 Hrs</u>	<u>40 Hrs</u>	<u>63 Hrs</u>
HG2	0.34	0.80	0.84	0.87	0.92
ATCC	0.34	0.28	0.24	0.20	0.17
LQ8	0.38	0.30	0.32	0.27	0.22

b) Azucares reductores de los sobrenadantes en mg xilosa/ml liquido.

<u>Cepa</u>	<u>0 Hrs</u>	<u>15 Hrs</u>	<u>25 Hrs</u>	<u>40 Hrs</u>	<u>63 Hrs</u>
HG2	0.05	0.05	0.10	0.10	0.05
ATCC	0.05	2.15	2.40	2.50	2.70
LQ8	0.05	1.85	2.30	2.30	2.70

TABLA XVIII
Efecto de la Fuente de Carbono en la Expresión de las Actividades Enzimáticas Extracelulares
del Microorganismo HG2

<u>Cepa</u>	<u>Actividad</u>	<u>Xilano</u>	<u>Xilosa</u>	<u>Celobiosa</u>	<u>Y.E.</u>	<u>Glucosa</u>
HG2	FPasa	0.004	0.004	0.002	NM	NM
	CMCasa	0.32	0.050	0.085	NM	0.035
	Xilanasa	1.45	0.035	0.005	NM	0.015

* NM: No hay actividad detectable

* FPasa y CMCasa expresadas en: mg Glucosa/ml-Hr

* Xilanasa en : mg Xilosa/ml-Hr

TABLA XIX

Desarrollo con el Tiempo de las Actividades Enzimáticas Extracelulares de la Cepa HG2 al Crecer en Xilano o Xilosa

<u>Cepa</u>	<u>Sustrato</u>	<u>Actividades</u>	<u>7 Hrs</u>	<u>12 Hrs</u>	<u>18 Hrs</u>	<u>24 Hrs.</u>
HG2	D-xilosa	FPasa	NM	NM	NM	NM
		CMCasa	0.012	0.020	0.025	0.075
		Xilanasa	0.010	0.020	0.030	0.080
<u>Cepa</u>	<u>Sustrato</u>	<u>Actividades</u>	<u>7 Hrs</u>	<u>12 Hrs</u>	<u>18 Hrs</u>	<u>24 Hrs.</u>
HG2	Xilano	FPasa	NM	0.004	0.001	NM
		CMCasa	0.06	0.22	0.40	0.17
		Xilanasa	0.27	1.05	1.50	0.50

* NM: No hay actividad detectable

* FPasa y CMCasa expresadas en : mg Glucosa/ml-Hr

* Xilanasa en : mg Xilosa/ml-Hr

De esta Tabla se puede concluir que dicho microorganismo tiene unas actividades hidrolíticas muy bajas cuando crece en xilosa en comparación con las que desarrolla cuando crece en xilano.

2. Capacidad de Degradar la Celulosa

Las cepas ATCC-27405 y LQ8 de C. thermocellum se sembraron también en diferentes azúcares, y como se puede observar por la Tabla XX, siempre se apreciaron todas las actividades enzimáticas analizadas independientemente del azúcar utilizado. Es de interés el hecho de que la cepa ATCC-27405 crece en glucosa y produce todas sus enzimas extracelulares. Esto contrasta con lo publicado anteriormente sobre C. thermocellum (Ng et al., 1977; García et al., 1979) debe notarse, sin embargo, que el crecimiento en glucosa presentó un tiempo de latencia más largo que en celobiosa. De interés es también el hecho, de que las actividades xilanasa fueron bien patentes cuando estos microorganismos crecieron en cualquiera de los azúcares analizados. Por lo tanto, debe de acumularse xilosa durante la fermentación por estos microorganismos de los sustratos celulosicos complejos.

Ya que las cepas de C. thermocellum no son capaces de utilizar xilosa como única fuente de carbono, existe la posibilidad de que este azúcar inhiba o afecte la utilización de los otros azúcares. Para confirmar esta hipótesis, se hizo un experimento en el cual la cepa ATCC-27405 de C. thermocellum se sembró en el medio CM⁴-celobiosa al que se adicionaron cantidades de xilosa

TABLA XX

Efecto de la Fuente de Carbono en la Expresión de las Actividades Enzimáticas Extracelulares de *C. thermocellum*

<u>Cepa</u>	<u>Actividad</u>	<u>Solka Floc</u>	<u>MN300</u>	<u>Celobiosa</u>	<u>Y.E.</u>	<u>Glucosa</u>
ATCC	FPasa	0.010	0.005	0.042	0.002	0.030
	CMCasa	1.50	1.82	4.35	0.025	1.42
	Xilanasa	1.20	1.05	3.45	0.020	1.25
LQ8	FPasa	0.018	ND	0.018	NM	ND
	CMCasa	2.50	ND	2.05	NM	ND
	Xilanasa	3.10	ND	2.75	NM	ND

Las actividades se determinaron al final de la fase de crecimiento exponencial

FPasa y CMCasa expresadas en: mg Glucosa/m -Hr

Xilanasa en: mg Xilosa/m -Hr

ND = no se determino

NM = no se detecto actividad

TABLA XXI

Indice de Inhibicion por D-Xilosa de C. thermocellum ATCC-27405

<u>Sustrato</u>	<u>Indice de Inhibicion</u>
Control CM4-Cb	0
CM4-Cb + 1 g/l xilosa	0.05
CM4-Cb + 2 " "	0.08
CM4-Cb + 3 " "	0.16
CM4-Cb + 4 " "	0.18
CM4-Cb + 5 " "	0.29
CM4-Cb + 6 " "	0.29
Control CM-4-xylosa	1

* Los valores fueron obtenidos al final de la fase exponencial de crecimiento.

* Indice de inhibicion como:

$$1 - \frac{\text{D.O. a 660 nm de los cultivos con xilosa}}{\text{D.O. a 660 nm del cultivo control (CM4-Cb)}}$$

* Cuando el Indice de Inhibicion es 0 = no inhibicion
1 = inhibicion completa

TABLA XXII

Electroforesis en gel de Poliacrilamida de las Proteinas Extra-celulares de *C. thermocellum* Cepas ATCC-27405 y LQ8 Crecidas en Celobiosa y del Microorganismo HG2 Crecido en el Xilano

(a) Electroforesis en gel de poliacrilamida. Natural

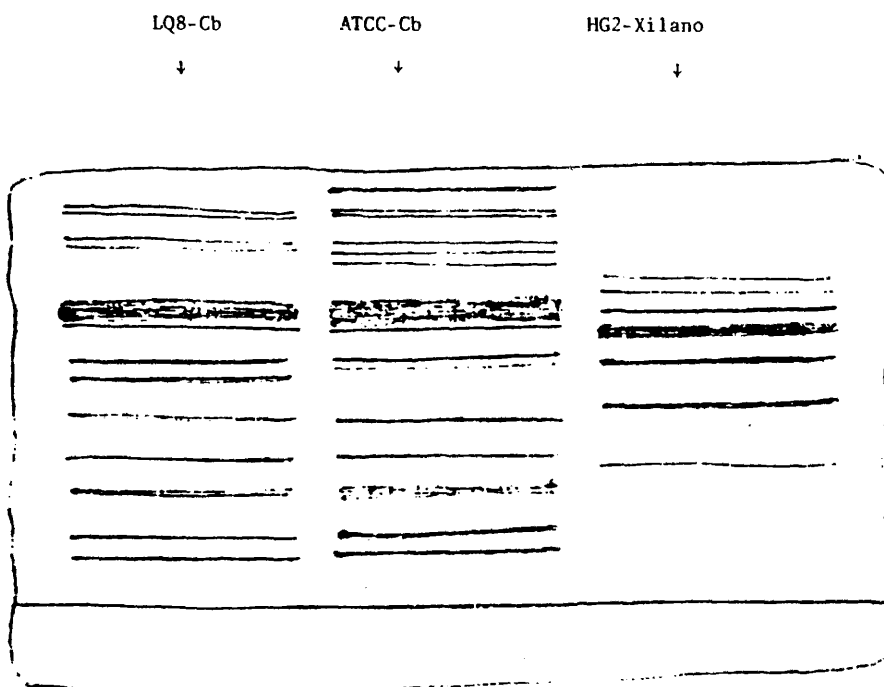


TABLA XXII (Continuacion)

(b) Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS

LQ8-Cb

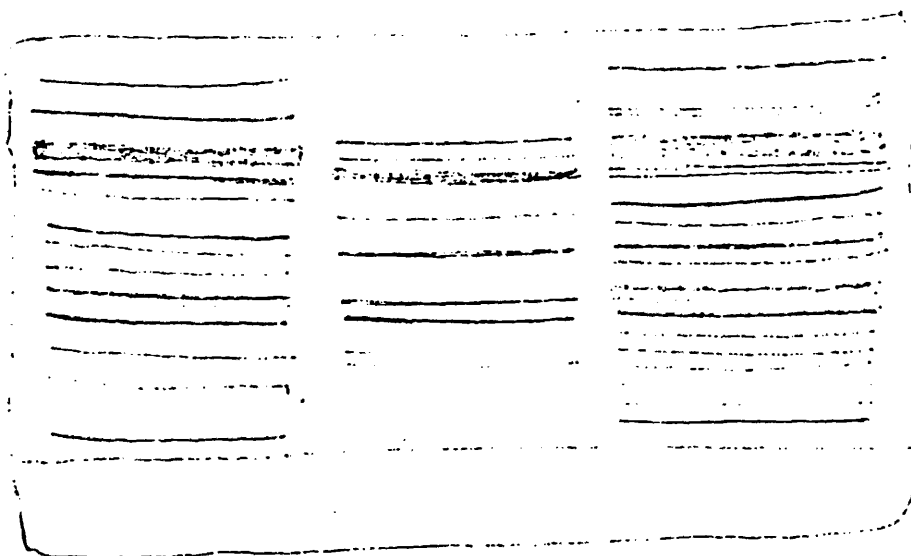
HG2-Xilano

ATCC-Cb

+

+

+



variables. Cuando fue maxima la concentracion de xilosa en el medio de celobiosa (6 g/l), solo se observo un indice de inhibicion del 0.29 (Tabla XXI).

Finalmente, cuando las proteinas extracelulares presentes en los cultivos de estos microorganismos se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS y natural), se pudo observar que ademas de la gran cantidad de proteinas extracelulares presentes la disposicion de las bandas era similar para las dos cepas de C.thermocellum, pero no para el microorganismo HG2. Esto refuerza mas la idea de que la cepa ATCC-27405 de C.thermocellum y el microorganismo HG2 son bien distintos (Tabla XXII).

C. Utilizacion de Carbohidratos por C.thermocellum ATCC-27405

Cuando C.thermocellum crece en sustratos organicamente complejos, aparecen y se acumulan en el medio de cultivo una gran variedad de azucares solubles (Wang et al 1976-1980). Existe la posibilidad de que estos azucares solubles se acumulan porque no pueden ser transportados y/o utilizados por estas celulas o porque estan sujetos a unos mecanismos muy rigurosos de control de incorporacion.

1. Azucares Utilizados por C.thermocellum ATCC-27405

C.thermocellum ATCC-27405 se inoculo en el medio complejo CM-4, con diferentes carbohidratos a una concentracion final de 6 y 10 g/l. El crecimiento se cuantifico midiendo el incremento en la densidad optica de los medios de cultivo a 660nm. C.thermocellum ATCC-27405, crecio en los azucares D-glucosa

y D-fructosa. También lo hizo en celulosa y en celobiosa pero no en otras hexosas analizadas como manosa, galactosa, sacarosa lactosa, ni en azucar-alcoholes como manitol e inositol. Ninguna de las pentosas analizadas soporto el crecimiento de este microorganismo; entre estas se incluían D-xilosa, D-arabinosa, D.ribose y xilano.

2. Crecimiento de *C.thermocellum* ATCC-27405 en D-Glucosa

Los cultivos "stock" de *C.thermocellum* ATCC-27405, mantenidos en celulosa Solka Floc como única fuente de carbono y energía, se transfirieron tres veces a tubos que contenían CM4-celobiosa, antes de sembrarse finalmente en otros que contenían o glucosa o celobiosa a una concentración final de 6 g/l. Los cultivos se incubaron anaerobicamente a 60°C y el crecimiento se siguió espectrofotométricamente a 660nm. La Figura 7 muestra el crecimiento de este microorganismo en glucosa o celobiosa. Como puede observarse, para empezar a crecer en glucosa este microorganismo requiere un período de latencia extenso, siendo la concentración final de células y la velocidad de crecimiento significativamente menores cuando el microorganismo crece en glucosa que cuando lo hace en celobiosa.

3. Adaptación de los Cultivos al Crecimiento en D-glucosa

Los cultivos de este microorganismo que crecieron por primera vez en glucosa, se siguieron sembrando en tubos que contenían glucosa durante unas 30 generaciones. Cuando estos cultivos se inocularon de nuevo en tubos con glucosa o

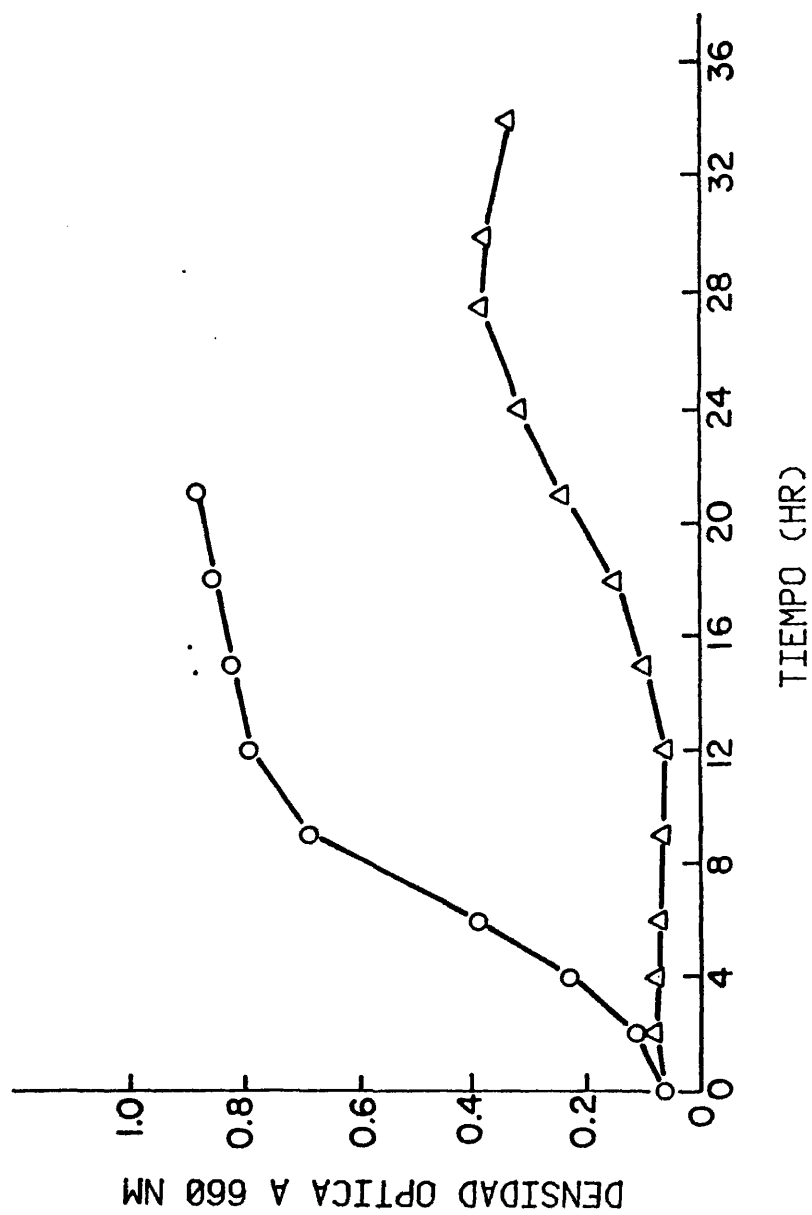


Figura 7: Crecimiento de *C. thermocellum* ATCC-27405 en Cellobiosa (O) y Glucosa (Δ).

celobiosa lo que se observo (Figura 8) fue un comportamiento diferente de los cultivos, dado que, el tiempo de latencia tan extenso que este microorganismo requiere para empezar a crecer en glucosa desaparece, pero todavia las concentraciones finales de celulas son mayores cuando el microorganismo crece en celobiosa que cuando lo hace en glucosa. De ahora en adelante estos cultivos se citaran como "adaptados a crecer en glucosa" o simplemente "adaptados a glucosa".

4. Estabilidad de los Cultivos "Adaptados a Glucosa"

Los cultivos "adaptados a crecer en glucosa" se sembraron durante 100 generaciones en celobiosa, 30 generaciones en celulosa Solka Floc y de nuevo durante otras 30 generaciones en celobiosa antes de inocularlos en tubos que contenian solo glucosa o celobiosa. En estos cultivos no se observo nunca mas el periodo de latencia extenso.

5. Caracterizacion de la Adaptacion a la Glucosa

a. Tiempo de Latencia

Se puede hipotetizar que el tiempo de latencia tan extenso que se observa en las celulas salvajes de C. thermocellum ATCC-27405 para iniciar su crecimiento en glucosa puede deberse a la presencia en la poblacion original de unas pocas celulas mutantes capaces de crecer en glucosa, a la perdida de la viabilidad y/o a esporulacion de las celulas en presencia de glucosa, o tambien debido al tiempo requerido para la expresion de las enzimas inducibles.

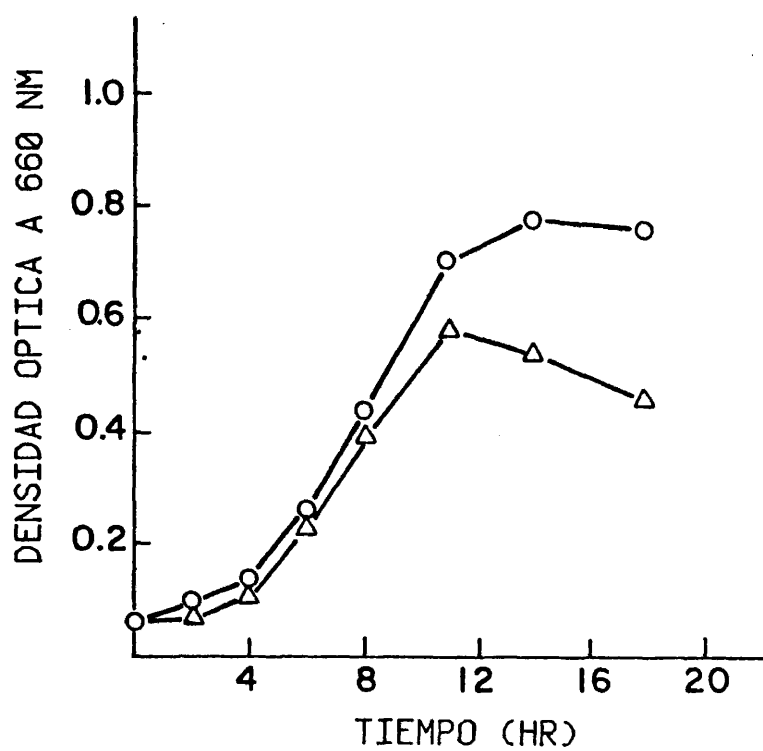


Figura 8: Crecimiento de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptado a Crecer en Glucosa en Celobiosa (O) y Glucosa (Δ).

Para determinar si el crecimiento de C.thermocellum en glucosa es consecuencia de la seleccion de unas pocas celulas mutantes o si la poblacion entera es capaz de crecer en este sustrato, es necesario calcular que proporcion de celulas de una poblacion original es capaz de crecer independientemente en glucosa o en celobiosa. Para cuantificar esta fraccion hay varias alternativas experimentales, pero quizas la mas rapida sea someter a una poblacion celular a un analisis del tipo del MPN (Numero Mas Probable). Con esta tecnica, las celulas de C. thermocellum, no adaptadas a crecer en glucosa, se dejaron crecer en el medio CM4-celobiosa hasta la mitad de su fase de crecimiento exponencial y seguidamente se inocularon por triplicado en tubos que contenian glucosa o celobiosa. Al cabo de 48 horas se calculo el numero mas probable de celulas que crecio en cada sustrato de acuerdo con unas Tablas Estandard

Los resultados que se muestran en la Tabla XXIII, demuestran, que una gran proporcion (20-40%) de las celulas que crecen en celobiosa y que no se han adaptado a hacerlo en glucosa, son capaces de crecer tambien en este azucar pero despues de un tiempo de latencia largo. Es importante hacer notar que los recuentos del MPN en glucosa y en celobiosa de los cultivos no adaptados a crecer en glucosa son los mismos que los de los cultivos adaptados a crecer en glucosa. Esto es, aun con los cultivos adaptados a crecer en glucosa la recuperacion en esta hexosa es solo el 10% de la que acaece en celobiosa. Por lo tanto, si se tiene en cuenta la eficiencia de la glucosa como fuente de carbono para la recuperacion de las celulas de C. thermocellum debe

TABLA XXIII

Valores MPN de *C. thermocellum* ATCC-27405 en Celobiosa y Glucosa

El Inoculo fue de Celulas No Adaptadas a Crecer en Glucosa

<u>Experimento</u>	<u>Azucar</u>	<u>Valores MPN, Media (celulas/ml)</u>	<u>Relacion (G/Cb x 100)</u>
1	Celobiosa	4.3×10^9	21.6
	Glucosa	9.3×10^8	21.6
2	Celobiosa	2.4×10^9	
	Glucosa	9.3×10^8	38.7

Control: El Inoculo fue de Celulas Adaptadas a Crecer en Glucosa

<u>Experimento</u>	<u>Azucar</u>	<u>Valores MPN, Media (celulas/ml)</u>	<u>Relacion (G/Cb x 100)</u>
1	Celobiosa	4.6×10^8	
	Glucosa	4.3×10^7	9.34

TABLA XXIV

Valores MPN de C. thermocellum ATCC-27405 Durante el Periodo de
 Latencia en Tubos con CM4-Glucosa
 El Inoculo fue de Celulas No Adaptadas a Crecer en Glucosa

Tiempo (Hrs)	Azucar	Valores MPN, Media (celulas/ml)	Relacion (G/Cb x 100)
0	Celobiosa	4.7×10^7	44.6
	Glucosa	2.1×10^7	
4	Celobiosa	1.2×10^8	35.8
	Glucosa	4.3×10^7	
8	Celobiosa	1.5×10^8	14.0
	Glucosa	2.1×10^7	
12	Celobiosa	4.6×10^8	20.2
	Glucosa	9.3×10^7	

de concluirse que todas las células de una población microbiana no adaptada a crecer en glucosa tienen la capacidad de crecer en dicho azúcar.

Durante el tiempo de latencia en el cual las células no manifestaron crecimiento en la glucosa se determinó también la viabilidad celular. La Tabla XXIV muestra los resultados obtenidos. El tiempo total de latencia fue de 26 horas y al menos durante las primeras 12 horas de este período la proporción de células que creció en celobiosa o en glucosa no cambió significativamente con relación a la población existente al comienzo del experimento. Tampoco durante este período se observó un incremento significativo en la esporulación de las células. Por lo tanto el período de latencia no implicó esporulación o pérdida de la viabilidad celular.

b. Efecto del Extracto de Levadura

Se ha publicado (Patni y Alexander, 1974) que C. thermocellum es capaz de crecer en glucosa solo cuando el extracto de levadura se encuentra en concentraciones altas en el medio de cultivo. Nosotros hemos analizado esta información con nuestra cepa. Los cultivos de C. thermocellum no adaptados a crecer en glucosa se crecieron 3 veces en CM4-celobiosa, se centrifugaron, se resuspendieron en el medio mínimo y finalmente se inocularon en tubos que contenían CM-4 o medio mínimo (MM, sin extracto de levadura), con los correspondientes azúcares, celobiosa o glucosa. Como control se llevó a cabo un experimento paralelo con células "adaptadas a glucosa". Los resultados se muestran en la Figura 9.

Figura 9: Crecimiento de C. thermocellum ATCC-27405 en un Medio Complejo

(CM-4) y en un Medio Mínimo (MM)

Celulas Adaptadas a Crecer en Glucosa sembradas en:

(▲) CM4-Cb

(●) CM4-G

(■) MM-Cb

(⊗) MM-G

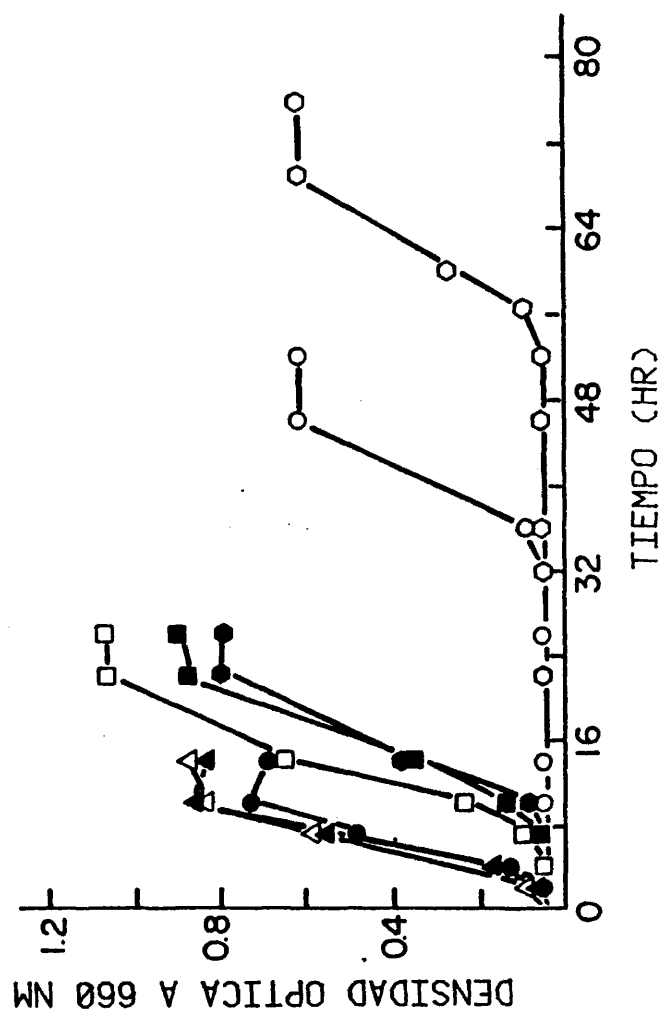
Celulas No Adaptadas a Crecer en Glucosa sembradas en:

(Δ) CM4-Cb

(○) CM4-G

(□) MM-Cb

(○) MM-G



El periodo de latencia observado para el crecimiento de este microorganismo en CM-4-glucosa fue de 32 a 36 horas. Y el observado para el crecimiento en MM-glucosa de 52-56 horas. Las concentraciones finales de células, aun en el cultivo adaptado a glucosa son menores cuando el microorganismo crece en MM-glucosa que cuando lo hace en MM-celobiosa. El punto importante a destacar es que C.thermocellum, no adaptado a crecer en glucosa, es capaz de hacerlo en este azucar aun sin la presencia del extracto de levadura.

C. Efecto del pH

Para determinar el efecto que el pH puede tener en la utilizacion de la glucosa o de la celobiosa por las células de C.thermocellum, se hizo un experimento en el cual las células de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa se inocularon en el medio CM-4 con glucosa o celobiosa a diferentes pH iniciales. Como se observa en la Figura 10 el pH inicial afecto a la concentracion final de células obtenidas y modifico las velocidades de crecimiento especificas. A pH menor de 6.1, los cultivos de C. thermocellum no fueron capaces de iniciar el crecimiento ni en celobiosa ni en glucosa.

El siguiente experimento se hizo con las células de este microorganismo no adaptadas a crecer en glucosa. Las células se sembraron en una mezcla de celobiosa y de glucosa, con la primera a una concentracion menor para permitir el crecimiento inicial del microorganismo sin una reduccion drastica del pH del medio. Se prepararon los controles pertinentes (tubos solo con celobiosa o

Figura 10: Efecto del pH Inicial en el Crecimiento de Celulas de C. thermocellum ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa, sembradas en Celobiosa (A) y Glucosa (B).

- (Δ) Crecimiento en Celobiosa (6 g/l)
- (C) Crecimiento en Glucosa (6 g/l)

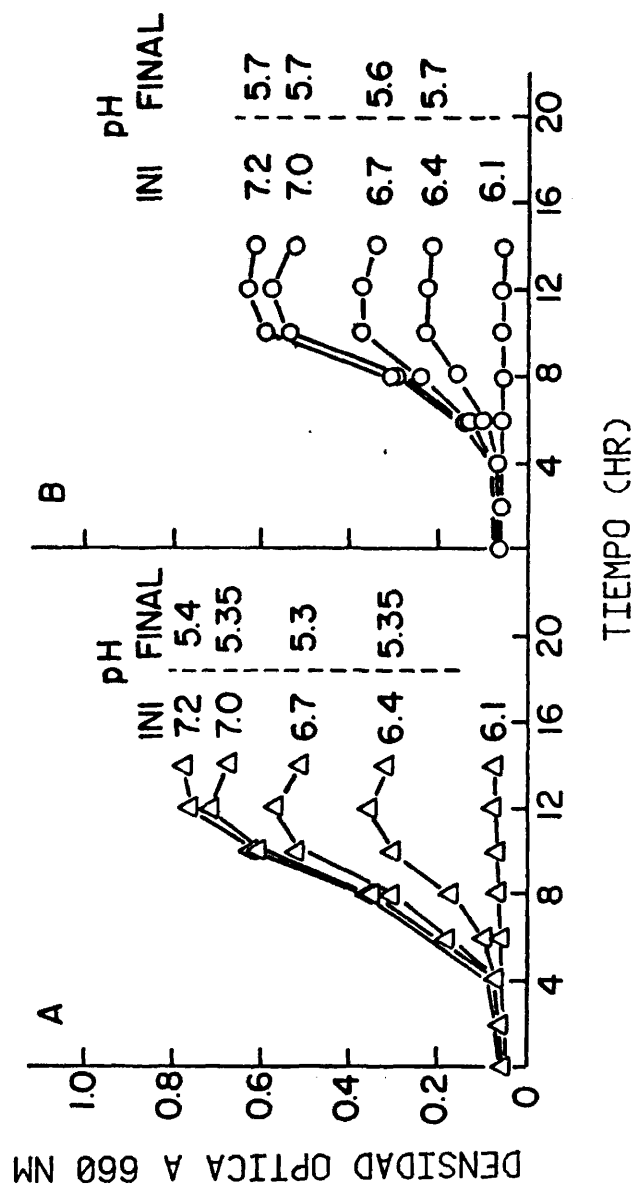
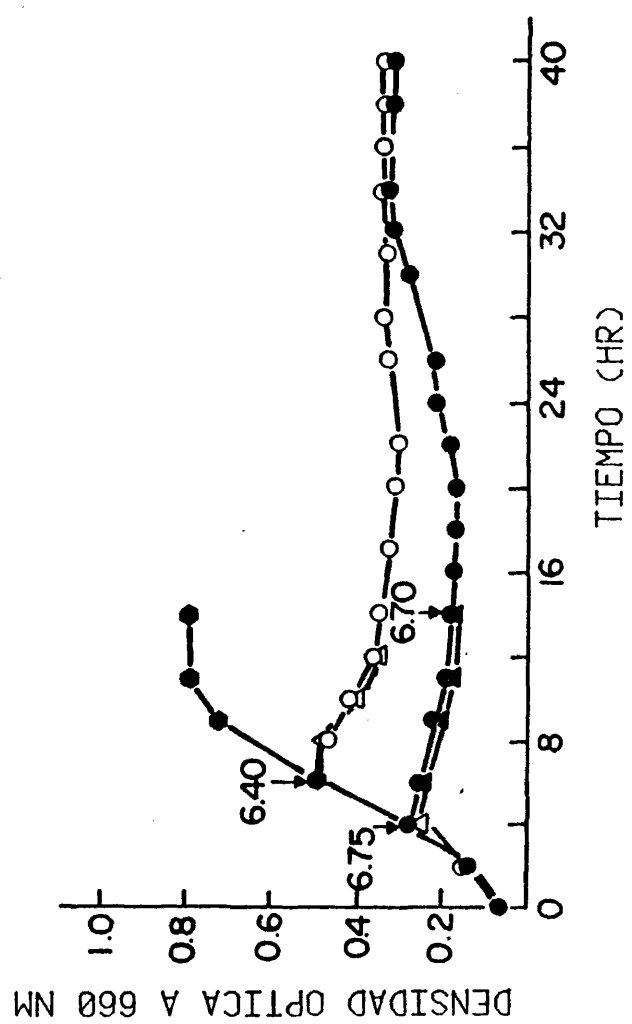


Figura 11: Crecimiento de C. thermocellum ATCC-27405, No Adaptado a Crecer en Glucosa, en:

- (▲) Cb 0.5 g/l
- (●) Cb 0.5 g/l + G 3.0 g/l
- (Δ) Cb 1.5 g/l
- (○) Cb 1.5 g/l + G 1.5 g/l
- (⊙) Cb 3.0 g/l



glucosa) y los resultados se muestran en la Figura 11. En los tubos que contenian CM-4-Cb 0.5 g/l + G 3 g/l, el crecimiento inicial de las celulas se detuvo cuando se consumio la celobiosa. El pH final del medio fue de 6.75-6.70. Despues de un periodo de latencia de unas 20 horas, se observo un incremento de la densidad optica del medio que indicaba crecimiento de las celulas en la glucosa. Sin embargo, en los tubos que contenian CM4-Cb 1.5 g/l + G 1.5 g/l, se detuvo el crecimiento inicial de las celulas cuando se agoto la celobiosa dando un pH final de 6.4 al medio de cultivo. No se observo crecimiento alguno ulterior de las celulas en glucosa.

d. Efecto de la Concentracion Inicial del Carbohidrato en las Concentraciones Finales de Celulas y en los Rendimientos Celulares Aparentes

La concentracion inicial del carbohidrato en el medio de cultivo no tuvo ningun efecto en el periodo de latencia de las celulas para iniciar el crecimiento en glucosa o en celobiosa. Sin embargo, esta concentracion inicial del azucar si que tuvo un efecto significativo en la concentracion final de celulas y en los rendimientos celulares aparentes obtenidos al final del crecimiento.

Los cultivos de C.thermocellum crecidos durante 10 generaciones en celobiosa (6 g/l), se inocularon en el medio CM-4 que contenian celobiosa o glucosa a diversas concentraciones. Se siguieron los cambios en la densidad optica de los medios de cultivo hasta que esta alcanzo su valor maximo. Este

valor se transformo en gramos de peso celular seco/litro y se represento en funcion de los valores de las concentraciones iniciales de carbohidrato (Figura 12). Los resultados indican que C. thermocellum bajo condiciones en las que el carbohidrato es el factor limitante, es capaz de alcanzar concentraciones mayores de celulas cuando crece en celobiosa que cuando lo hace en glucosa a concentraciones equivalentes de carbohidrato.

El mismo experimento se repitio con celulas de C. thermocellum adaptadas a crecer en glucosa. Los resultados se muestran en la Figura 13. Esta vez, aunque las concentraciones de celulas obtenidas en glucosa fueron mas bajas que en celobiosa, las concentraciones maximas de celulas en glucosa eran mayores que las alcanzadas con las celulas no adaptadas a crecer en glucosa. La Tabla XXV resume los resultados que muestran las Figuras 12 y 13.

6. Eficiencia de la Conversion a Productos Finales de las Celulas de C. thermocellum Adaptadas a Crecer en la Glucosa al Crecer en Glucosa o en Celobiosa

Se puede hipotetizar que hay esencialmente dos razones por las cuales los rendimientos celulares aparentes cambian dependiendo del carbohidrato empleado: una, es que depende de la manera en que los azucares se transportan al interior de la celula, y otra, es que depende de los productos catabolicos finales obtenidos.

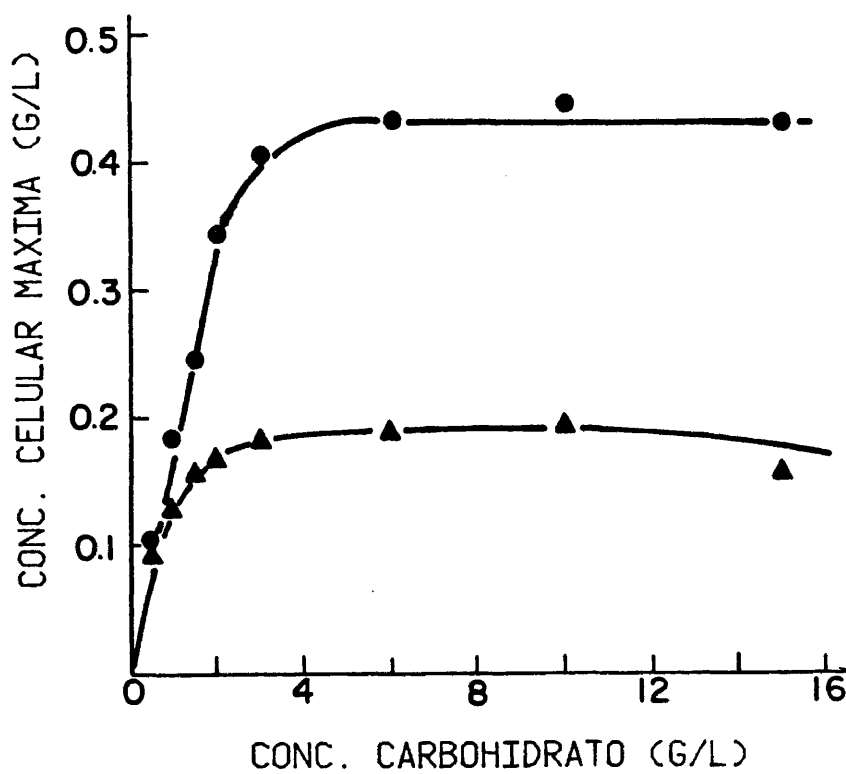


Figura 12: Efecto de la Concentracion Inicial del Carbohidrato en la Concentracion Final de las Celulas. El Inoculo Fueron Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, No Adaptadas a Crecer en Glucosa.

- (●) Crecimiento en la Celobiosa
- (▲) Crecimiento en la Glucosa

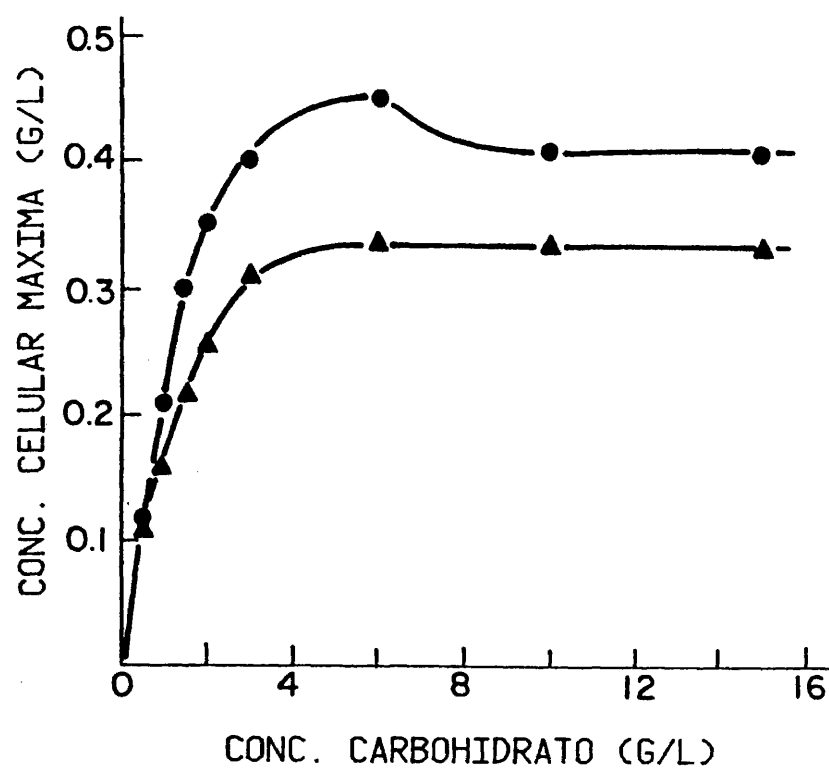


Figura 13: Efecto de la Concentracion Inicial del Carbohidrato en la Concentracion Final de Celulas. El Inoculo fue Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa.

(●) Crecimiento en Celobiosa

(▲) Crecimiento en Glucosa

TABLA XXV

Rendimientos Celulares Aparentes de *C. thermocellum* ATCC-27405
 Cuando Crece en Celobiosa o en Glucosa

Inoculo	Azucar (g/l)	Rendimiento Celular ¹	
		Celobiosa	Glucosa
No Adaptado en Glucosa	0.5	0.210	0.190
	1.0	0.185	0.130
	1.5	0.160	0.103
	2.0	0.170	0.080
	6.0	0.072	0.031
	15.0	0.021	0.008
Adaptado a Glucosa	0.5	0.240	0.230
	1.0	0.210	0.160
	1.5	0.200	0.143
	2.0	0.175	0.128
	6.0	0.75	0.056
	15.0	0.021	0.015

1. Los rendimientos celulares aparentes se expresan en gms de células producidas (peso celular seco) por gm. de azúcar consumido.

Los cultivos de C.thermocellum ATCC-27405, adaptados a crecer en glucosa, se crecieron en glucosa durante 10 generaciones y finalmente se inocularon en tubos de CM-4 que contenian celobiosa o glucosa. La cinetica del crecimiento y de la formacion de los productos finales se obtuvo al crecer el microorganismo en celobiosa (Figura 14) o en glucosa (Figura 15). El valor mas alto de la densidad optica de los cultivos señalo el final del tiempo de fermentacion. La Tabla XXVI resume los resultados de las Figuras 14 y 15. Como se observa en la Tabla XXVI, los rendimientos en productos finales son esencialmente los mismos cuando el microorganismo crece en glucosa que cuando lo hace en celobiosa, pero las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes son diferentes.

Ya que los rendimientos en productos finales son esencialmente los mismos, pero no las concentraciones finales de celulas ni los rendimientos celulares aparentes, las diferencias arriba observadas parecen deberse a la forma en la que los azucares celobiosa y glucosa se transportan en C. thermocellum.

D. Crecimiento y Cinetica de la Utilizacion de Azucares por C. thermocellum ATCC-27405 Cuando Crece en una Mezcla de Celobiosa y Glucosa

Cuando C.thermocellum ATCC-27405 crece en sustratos organicamente complejos solo la celobiosa , la D.-glucosa y quizas algunas celodextrinas de cadena corta van a utilizarse como fuentes de carbono y energia. Lo que sobresale de la utilizacion de la glucosa, es el periodo de latencia tan largo que este microorganismo



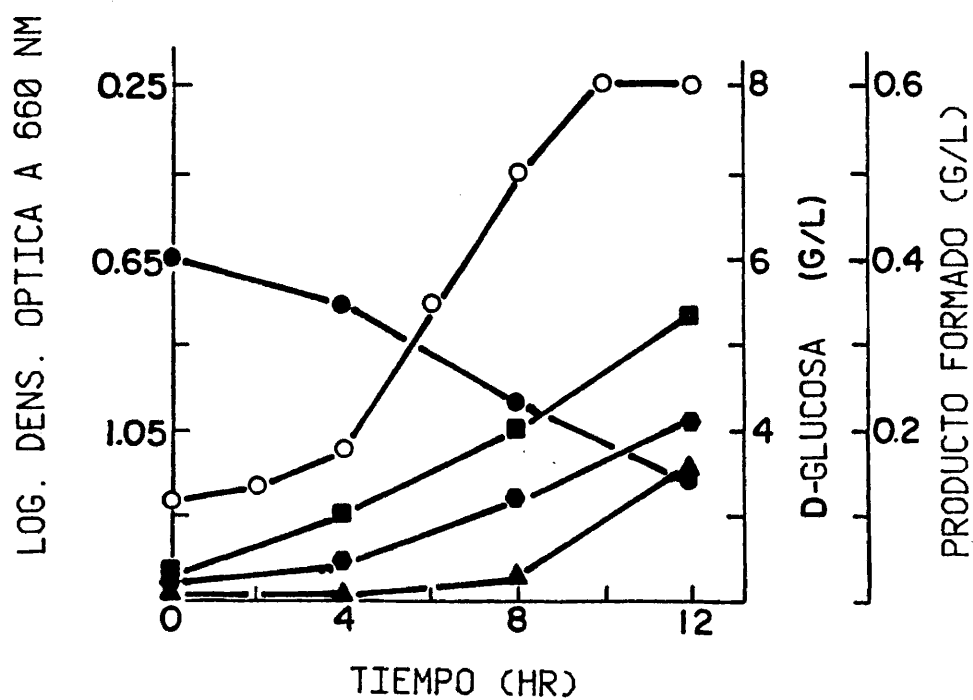


Figura 14: Cinetica del Crecimiento y de la Formacion de Productos Finales, en Cultivos de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa, Cuando Crecen en Celobiosa.

- (○) crecimiento
- (●) consumo de celobiosa
- (■) etanol
- (◆) acido acetico
- (▲) acido lactico

Figura 15: Cinetica del Crecimiento y de la Formacion de Productos Finales en Cultivos de C. thermocellum ATCC-27405, Adaptados a Crecer en Glucosa, Cuando Crecen en Glucosa.

- (○) crecimiento
- (●) consumo de glucosa
- (■) etanol
- (⊗) acido acetico
- (▲) acido lactico

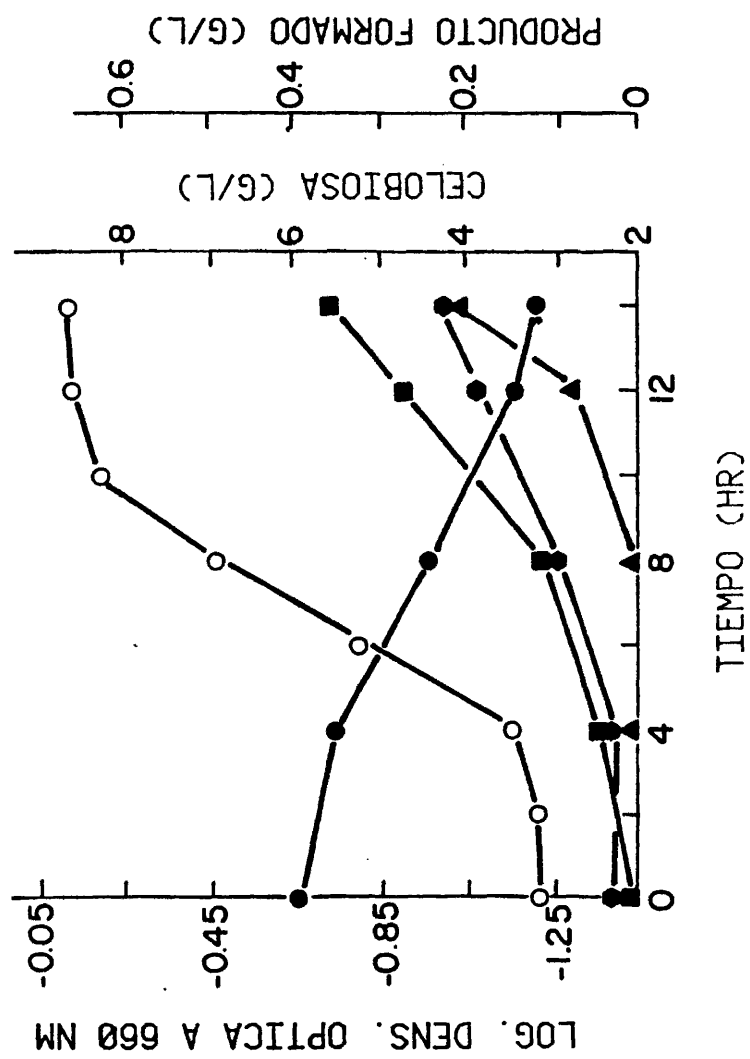


TABLA XXVI

Efecto del Sustrato en las Eficiencias de Conversion a Productos Finales. El Inoculo Eran Celulas de C. thermocellum ATCC-27405 Adaptadas a Crecer en Glucosa

		<u>Celobiosa</u>	<u>Glucosa</u>
Tiempo de Fermentacion,	hr	14	12
pH Final		5.40	5.85
Azucar Consumido,	g/l	2.77	2.61
Peso Celular Seco,	g/l	0.48	0.37
Etanol Producido,	g/l	0.36	0.34
Acido Acetico,	g/l	0.22	0.22
Acido Lactico,	g/l	0.22	0.15
Rendimiento en Celulas,	g/g	0.17	0.14
Rendimiento en Etanol,	g/g	0.13	0.13
Rendimiento en A. Acetico,	g/g	0.08	0.08
Rendimiento en A. Lactico,	g/g	0.08	0.06

Relacion Molar:	ETOH: ACOH: Lactico	ETOH: ACOH
Celobiosa	3.25: 1.50: 1.0	2.2: 1.0
Glucosa	4.40: 2.20: 1.0	2.0: 1.0

requiere para empezar a crecer en este sustrato. Sin embargo, los cultivos de este microorganismo adaptados a crecer en glucosa ya nunca mas necesitan de este periodo de latencia para empezar a crecer en glucosa. En esta seccion nos ocuparemos de la utilizacion preferencial de azucares por C.thermocellum.

1. Crecimiento y Cinetica de la Utilizacion de Celobiosa y D-Glucosa

Para este estudio se utilizaron los cultivos de C.thermocellum ATCC-27405, adaptados y no adaptados a crecer en glucosa. Las celulas se inocularon en el medio CM-4 que contenia 1.5 g. de celobiosa/litro mas 1.5 g. de glucosa/litro. Los tubos se incubaron a 60°C y el crecimiento se siguio espectrofotometricamente a 660nm. Periodicamente, se determinaron las concentraciones de celobiosa y glucosa en el medio de cultivo.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos con las celulas salvajes de C.thermocellum. La celobiosa fue el primer azucar en ser utilizado. De hecho, estas celulas no consumieron ninguna glucosa durante las 8 primeras horas de fermentacion. Al final de 40 horas de fermentacion solamente se habian utilizado 600 mg/ml de glucosa pero el consumo de glucosa tuvo lugar sin un incremento detectable de la masa celular.

Por el contrario, cuando las celulas de C.thermocellum adaptadas a crecer en glucosa se sembraron en una mezcla de celobiosa y glucosa el azucar que primero se utilizo fue la glucosa. Mas aun, la celobiosa no se utilizo hasta que toda la glucosa desaparecio del medio de cultivo (Figura 17).

Figura 16: Crecimiento (○), Utilización de Glucosa (□) y Utilización de Celobiosa (○) por Celulas de C. thermocellum ATCC-27405, No Adaptadas a Crecer en Glucosa, al Crecer en una Mezcla de Glucosa y Celobiosa a 1.5 g/l Cada Una.

(●) Crecimiento en Celobiosa (1.5 g/l)

(▲) Crecimiento en Glucosa (1.5 g/l)

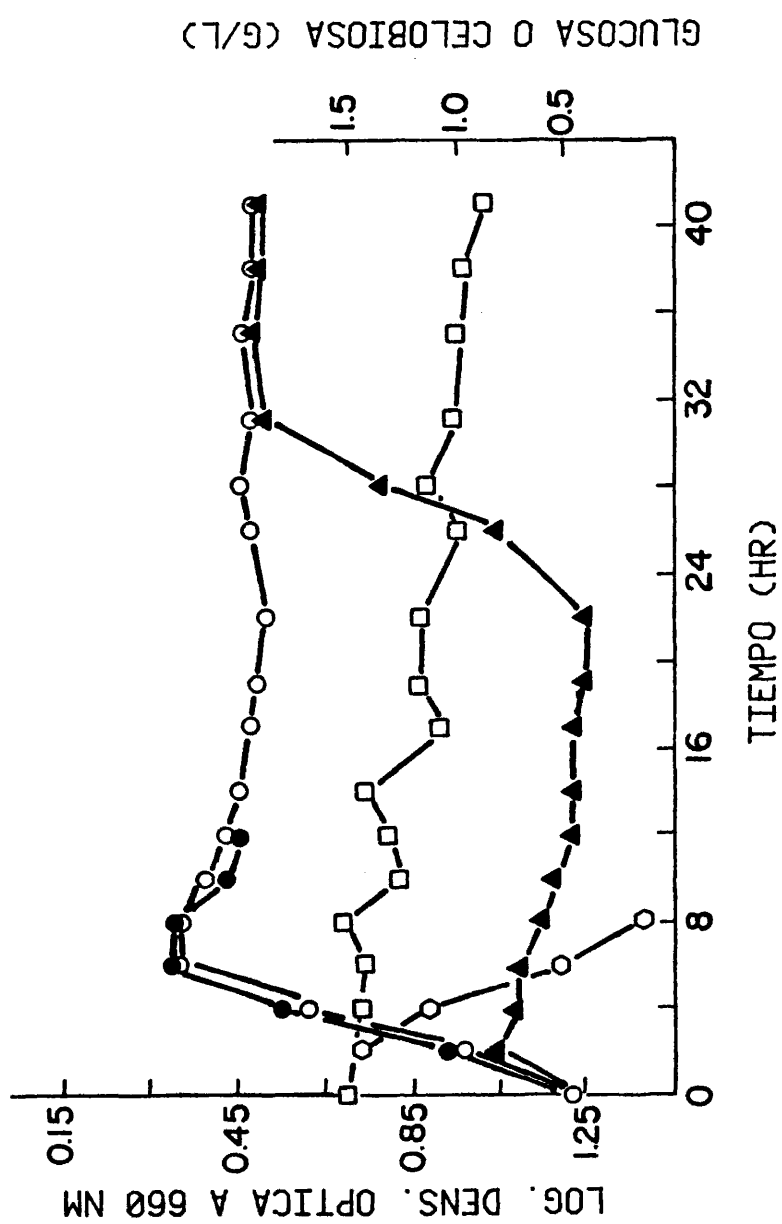
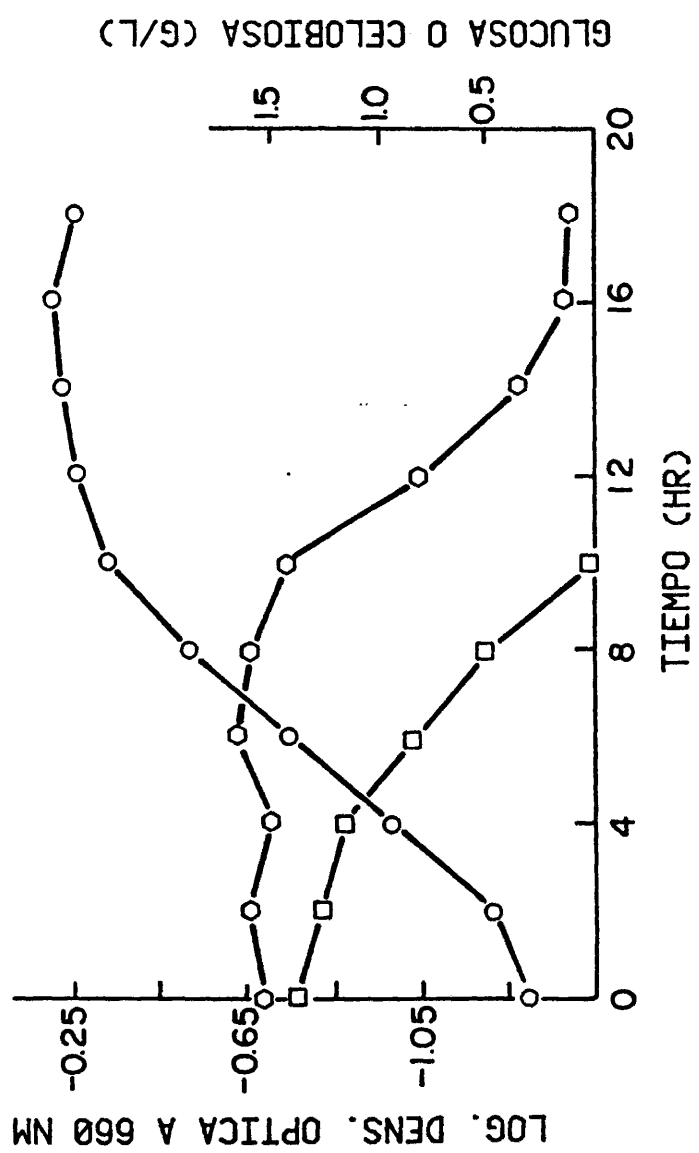


Figura 17: Crecimiento (○), Utilizacion de Glucosa (□) y Utilizacion de Celobiosa (○) por Celulas de C. thermocellum ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa, al Crecer en una Mezcla de Glucosa y Celobiosa a 1.5 g/l Cada Una.



Para analizar mas de cerca el mecanismo de utilizacion preferencial de la glucosa frente a la celobiosa por los cultivos de este microorganismo adaptados a crecer en glucosa, se hizo un experimento, en el cual las células adaptadas a crecer en glucosa se inocularon en el medio CM-4 con celobiosa a una concentracion de 1.5 g/l y cuando las células alcanzaron la mitad de su fase de crecimiento exponencial se añadió glucosa al medio de cultivo a una concentracion final de 1.5 g/l. Como se observa en la Figura 18, la glucosa se empezó a utilizar inmediatamente mientras que la velocidad de utilizacion de la celobiosa decrecio muchísimo.

De este ultimo experimento se deduce que la glucosa por si misma ejerce una presion reguladora en el mecanismo de utilizacion de celobiosa. Cual es entonces la naturaleza intrínseca de este mecanismo de regulacion?

Los experimentos realizados (Tabla XXVII) con células no adaptadas, demuestran que cuando estas células crecen en una mezcla de glucosa (6.0 g/l) y celobiosa a diferentes concentraciones las concentraciones finales de células y la velocidad de crecimiento son similares a los del experimento control en el que la celobiosa es el unico azúcar presente. Este experimento indica que en las células de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa la accion de la glucosa sobre la utilizacion de la celobiosa debe de ser intracelular bien inhibiendo el mecanismo de transporte de la celobiosa o bien su metabolismo.

Figura 18: Efecto de la Adición de Glucosa a Celulas de C. thermocellum ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa, Creciendo Exponencialmente en Celobiosa.

- (●) crecimiento
- (→) adición de glucosa (1.5 g/l)
- (□) consumo de glucosa
- (△) consumo de celobiosa

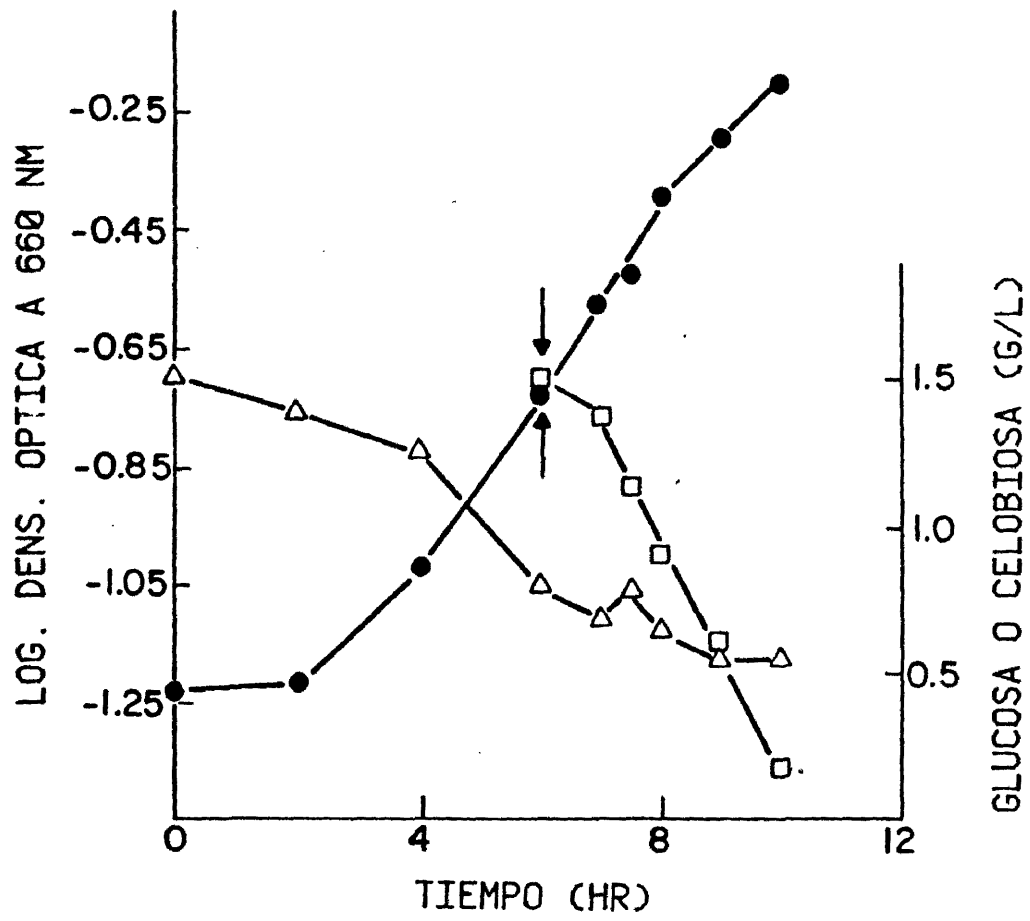


TABLA XXVII

Efecto de la Glucosa en el Crecimiento en Celobiosa de Celulas de C. thermocellum ATCC-27405 No Adaptadas a Crecer en Glucosa

<u>Medio</u>	<u>Conc. Finales Celulas en g/l</u>
Glucosa 6.0 g/l + Celobiosa 1.0 g/l	0.22
Glucosa 6.0 g/l + Celobiosa 1.5 g/l	0.26
Glucosa 6.0 g/l + Celobiosa 2.0 g/l	0.38
Glucosa 6.0 g/l + Celobiosa 3.0 g/l	0.48
Celobiosa 1.0 g/l	0.23
Celobiosa 1.5 g/l	0.29
Celobiosa 2.0 g/l	0.39
Celobiosa 3.0 g/l	0.45
Glucosa 6.0 g/l	0.43

TABLA XXVIII

Actividad Celobiosa Fosforilasa
de C. thermocellum ATCC-27405

	Actividad Esp.	Km
Celulas Adaptadas	0.164	1.17×10^{-3}
Celulas No Adaptadas	0.134	0.48×10^{-3}

Actividad especifica en micromoles de NADPH producidos/min. x mg proteina

Km aparente, la concentracion es molar (M)

Celulas adaptadas a glucosa, crecidas en D-glucosa

Celulas no adaptadas a glucosa, crecidas en celobiosa

Ya que el mecanismo molecular del transporte de celobiosa no se conoce en este microorganismo solo es posible observar el efecto inhibidor de la glucosa en la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa la primera enzima involucrada en el metabolismo de la celobiosa y quizas tambien en su transporte.

2. Actividad Celobiosa Fosforilasa. Inhibicion In vitro por la D-Glucosa

Inicialmente, se hizo un experimento en el cual se determino la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa en celulas de C. thermocellum adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa. Los resultados se muestran en la Tabla XXVIII. Ambos tipos de celulas comparten para esta enzima valores similares de actividad especifica y de Km. No hay represion de su sintesis en los cultivos adaptados a crecer en glucosa, indicando que su sintesis es constitutiva. El paso siguiente, fue determinar el efecto que la D-glucosa puede tener en la actividad de esta enzima. Como se observa en la Tabla XXIX, la glucosa inhibio la actividad de esta enzima. La Figura 19 representa los resultados obtenidos cuando los valores de la Tabla XXIX se representan graficamente en un diagrama de Lineweaver-Burk tras someter los datos experimentales a un analisis estadistico por regresion lineal. La glucosa inhibe la actividad celobiosa fosforilasa de manera no-competitiva. Sin embargo, el analisis teorico de los datos obtenidos de esta manera es dificil de interpretar. Por ello, se penso que podia haberse introducido algun error al analizar los valores experimentales por regresion lineal. Los

TABLA XXIX

Inhibición in vitro de la Actividad Celobiosa Fosforilasa por la D-Glucosa

Sustrato [S]	Inhibidor [I]	Activ. Especifica (V)	1/(V)	1/[S]
Celobiosa 20 mM	Ninguno	0.130		
" 10 mM	"	0.126		
" 5 mM	"	0.108	9.25	0.2
" 2 mM	"	0.079	12.65	1
" 1 mM	"	0.056	17.85	1
" 0.5 mM	"	0.036	27.77	2
Celobiosa 5 mM	Glucosa 1.5 mM	0.055	18.18	0.2
" 2 mM	" 1.5 mM	0.034	29.41	0.5
" 1 mM	" 1.5 mM	0.019	52.63	1
" 0.5 mM	" 1.5 mM	0.012	83.33	2
Celobiosa 5 mM	Glucosa 1 mM	0.073	13.69	0.2
" 2 mM	" 1 mM	0.041	24.39	0.5
" 1 mM	" 1 mM	0.028	35.71	1
" 0.5 mM	" 1 mM	0.018	55.55	2
Celobiosa 5 mM	Glucosa 0.5 mM	0.084	11.90	0.2
" 2 mM	" 0.5 mM	0.053	18.86	0.5
" 1 mM	" 0.5 mM	0.037	27.02	1
" 0.5 mM	" 0.5 mM	0.020	50.00	2
Celobiosa 5 mM	Glucosa 0.25 mM	0.085	11.76	0.2
" 2 mM	" 0.25 mM	0.064	15.02	0.5
" 1 mM	" 0.25 mM	0.049	20.40	1
" 0.5 mM	" 0.25 mM	0.026	38.46	2

* Las concentraciones de sustrato e inhibidor son mM

* Actividad específica (V), en micromoles de NADPH producido/min. x mg proteína

* 1/(V), en (micromoles NADPH producido/min. x mg proteína)⁻¹

* 1/[S], en (mM)⁻¹.

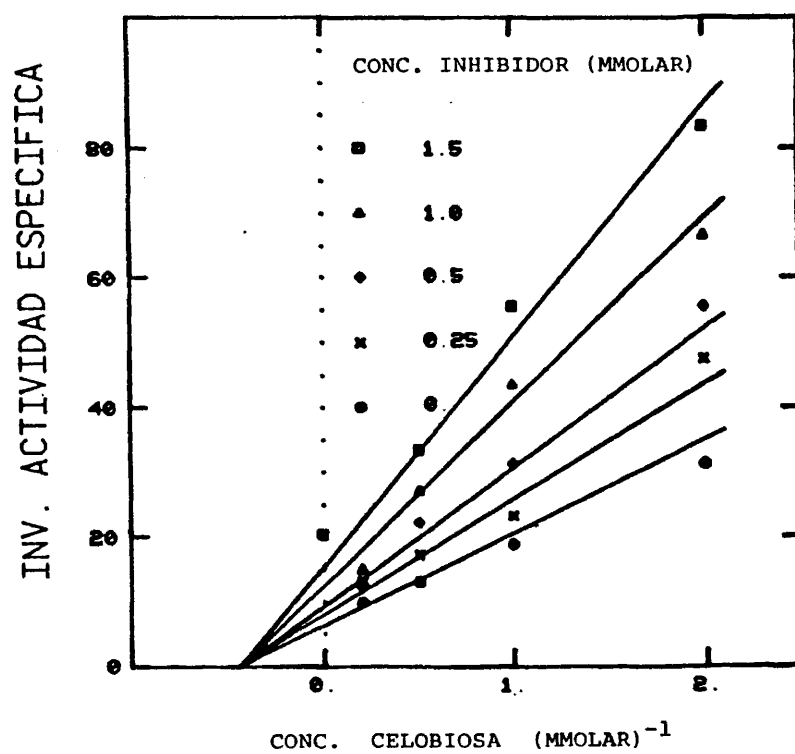


Figure 19: Actividad Celobiosa Fosforilasa. Inhibición *in vitro* por la Glucosa. Análisis Estadístico de los Datos Experimentales por Regresión Lineal.

misimos datos experimentales de la Tabla XXIX se sometieron a un analisis estadistico por regresion no-lineal y los resultados se representaron de nuevo graficamente en un diagrama de Lineweaver-Burk (Figuras 20 y 21). El analisis de la Figura 21 revela que la inhibicion de la enzima celobiosa fosforilasa por la glucosa es de hecho competitiva con una K_i de $0.43 \times 10^{-3} M$. El resto de los parametros cineticos de esta actividad celobiosa fosforilasa fueron una V_{max} de 0.126 micromoles de NADPH producidos /min. x mg de proteina y una K_m de $1.18 \times 10^{-3} M$.

3. Actividad β -glucosidasa. Inhibicion In Vitro por la D-Glucosa

La actividad de la enzima β -glucosidasa se sometio al mismo tipo de analisis que la de la enzima celobiosa fosforilasa.

En la Figura 22 se presenta la actividad de la enzima β -glucosidasa en celulas de C. thermocellum adaptadas a crecer en glucosa. Esta actividad se determino en presencia y en ausencia de fosforo inorganico para estar seguros de que esta actividad es diferente de la de la enzima celobiosa fosforilasa y a diferentes temperaturas para estar seguros de que la temperatura afecta a la velocidad de la reaccion. Los controles experimentales demostraron que el sustrato de esta enzima solamente se hidroliza cuando en la mezcla reaccionante estan presentes los extractos libres de celulas.

La Tabla XXX muestra que la actividad β -glucosidasa es practicamente la misma en las celulas adaptadas que en las no adaptadas a crecer en glucosa siendo la actividad especifica un poco mayor cuando el buffer

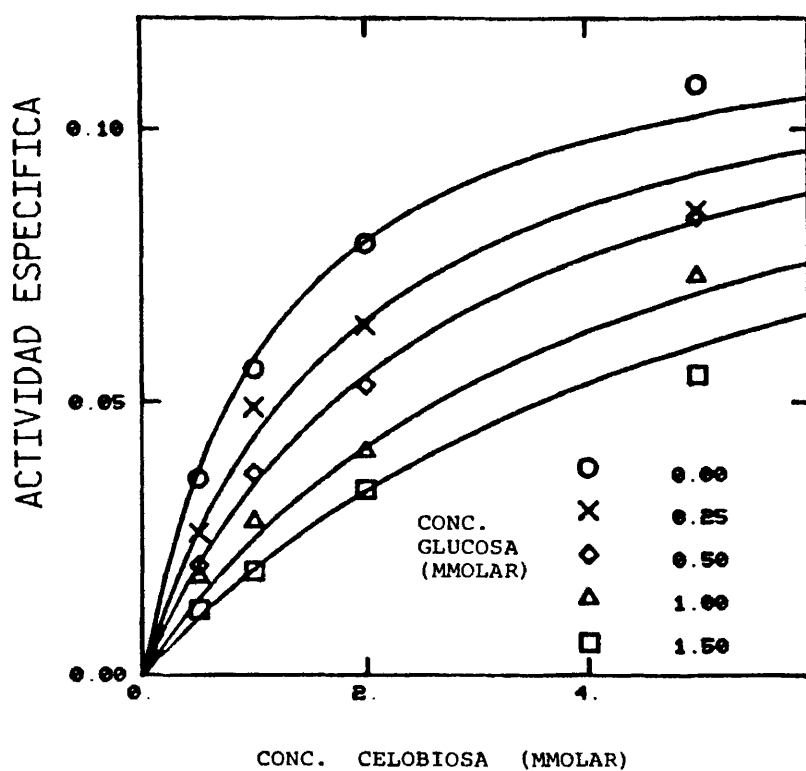


Figura 20: Actividad Celobiosa Fosforilasa. Inhibición in vitro por la Glucosa. Analisis Estadístico de los Datos Experimentales por Regresión no Lineal.

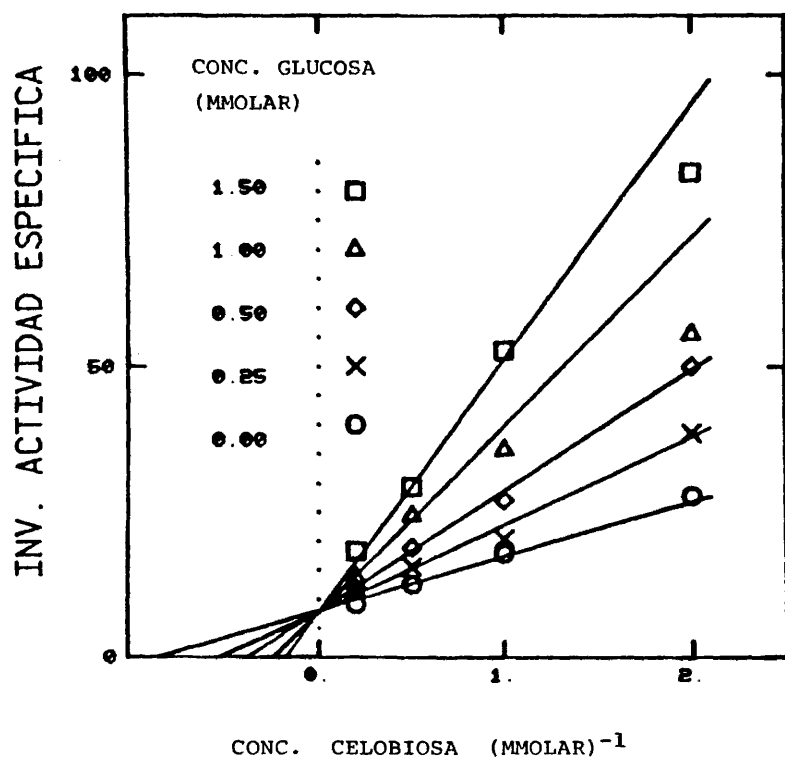
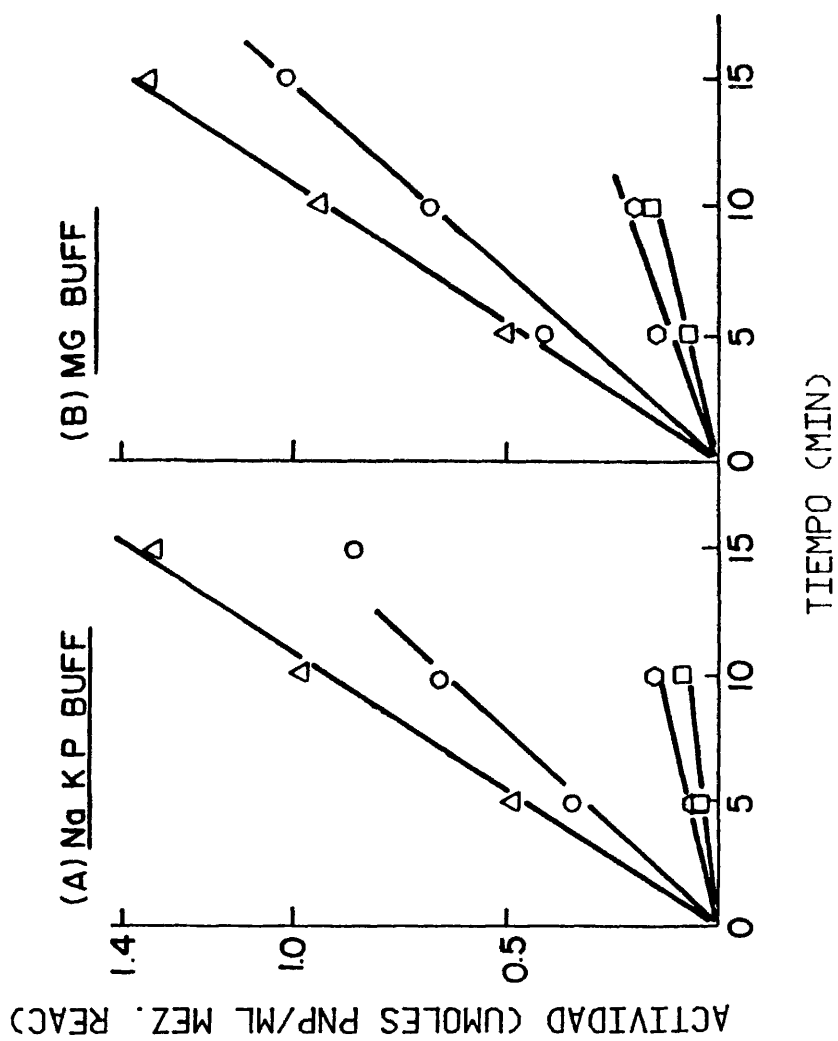


Figura 21: Diagrama de Lineweaver-Burk para la Actividad Celobiosa Fosforilasa. Inhibición in vitro por la Glucosa.

Figura 22: Actividades β -Glucosidasa de los Extractos Libres de Celulas de C. thermocellum ATCC-27405, No Adaptadas a Crecer en Glucosa, en Presencia (A) y en Ausencia (B) de Fosforo Inorganico.

- (Δ) 0.030 ml de extracto libre de celulas
- (\odot) 0.020 ml de extracto libre de celulas
- (\circ) 0.020 ml, reaccion a temperatura ambiente
- (\square) 0.020 ml, reaccion a 37°C



usado contine fosforo inorganico. Posiblemente esto se debe a la contribucion de la actividad celobiosa fosforilasa a la hidrolisis de la celobiosa.

La Tabla XXXI muestra que la glucosa solo inhibe ligeramente la actividad de esta enzima tanto en presencia como en ausencia de fosforo inorganico. Los resultados experimentales de la Tabla XXXI se sometieron a analisis estadistico por regresion no-lineal y los resultados se observan en las Figuras 23, 24, 25 y 26. De la Figura 24, se deduce que la K_i de la glucosa es de $23.78 \times 10^{-3} M$, la V_{max} es de 1.51 micromoles de p-nitrofenol producidos/min. x mg proteina y la K_m es de $2.10 \times 10^{-3} M$. La Figura 26 indica que $K_i = 17.03 \times 10^{-3} M$; $V_{max} = 1.74$ micromoles de p-nitrofenol producidos /min. x mg proteina y $K_m = 2.33 \times 10^{-3} M$.

4. Estabilidad de la Utilizacion Preferencial de Glucosa Frente a la Celobiosa

Los cultivos de C. thermocellum ATCC-27405, adaptados a crecer en glucosa, se crecieron durante unas 100 generaciones en celobiosa y seguidamente se inocularon en tubos que contenian una mezcla de celobiosa y glucosa a una concentracion final de 1.5 g/l de cada una. Como se ve en la Figura 27, estos cultivos utilizaron la glucosa preferentemente a la celobiosa, pero sin embargo, ambos azucares parecen estar siendo utilizados simultaneamente. Estos cultivos se transfirieron otra vez durante unas 15 generaciones a tubos que contenian celulosa Solka Floc y de nuevo se inocularon en tubos

TABLA XXX

Actividad B-Glucosidasa de C. thermocellum ATCC-27405

	Actividad Especifica en	
	<u>Buffer Na-K-P</u>	<u>Buffer MG</u>
Celulas Adapatas	0.913	0.878
Celulas No Adaptadas	0.912	0.813

Actividad especifica en micromoles de p-nitrofenol liberado/min. x mg proteina

Temperatura del ensayo, 60°C

TABLA XXXI

Inhibición de la Actividad B-glucosidasa por la D-Glucosa

(A) En 50 mM Na-K-P buffer pH=7.2

Sustrato [S]	Inhibidor [I]	Actividad Especifica [V]	1/(V)	1/(LS)
PNPG, 4 mM	Ninguno	1.043	.95	0.25
PNPG, 2 mM	"	.641	1.56	0.50
PNPG, 1 mM	"	.519	1.92	1
PNPG, 0.5 mM	"	.285	3.50	2
PNPG, 4 mM	Glucosa 5 mM	.865	1.156	0.25
PNPG, 2 mM	" 5 mM	.773	1.29	0.50
PNPG, 1 mM	" 5 mM	.460	2.17	1
PNPG, 0.5 mM	" 5 mM	.244	4.09	2
PNPG, 4 mM	Glucosa 10mM	.875	1.14	0.25
PNPG, 2 mM	" 10mM	.600	1.66	0.50
PNPG, 1 mM	" 10mM	.346	2.92	1
PNPG, 0.5 mM	" 10mM	.183	5.46	2
PNPG, 4 mM	Glucosa 15mM	.855	1.169	0.25
PNPG, 2 mM	" 15mM	.610	1.639	0.50
PNPG, 1 mM	" 15mM	.315	3.17	1
PNPG, 0.5 mM	" 15mM	.193	5.18	2

TABLA XXXI
(Continuacion)

(B) En 100 mM MG buffer, pH=7.2

Sustrato [S]	Inhibidor [I]	Actividad Especifica (V)	1/(v)	1/[S]
PNPG, 4 mM	Ninguno	1.089	.918	0.25
PNPG, 2 mM	"	.845	1.183	.50
PNPG, 1 mM	"	.539	1.855	1
PNPG, 0.5 mM	"	.315	3.17	2
PNPG, 4 mM	Glucosa 5 mM	1.089	.918	0.25
PNPG, 2 mM	" 5 mM	.641	1.56	0.50
PNPG, 1 mM	" 5 mM	.488	2.04	1
PNPG, 0.5 mM	" 5 mM	.285	3.50	2
PNPG, 4 mM	Glucosa 10mM	.906	1.103	0.25
PNPG, 2 mM	" 10mM	.641	1.56	0.50
PNPG, 1 mM	" 10mM	.366	2.73	1
PNPG, 0.5 mM	" 10mM	.213	4.69	2

*Temperatura del ensayo 60°C

*Las concentraciones de sustrato e inhibidor son mM

*Actividad especifica, (V), en micromoles de p-nitrofenol/min. x mg proteina

*1/(V) en (micromoles de p-nitrofenol producido /min. x mg proteina)⁻¹

*1[S] en (mM)⁻¹

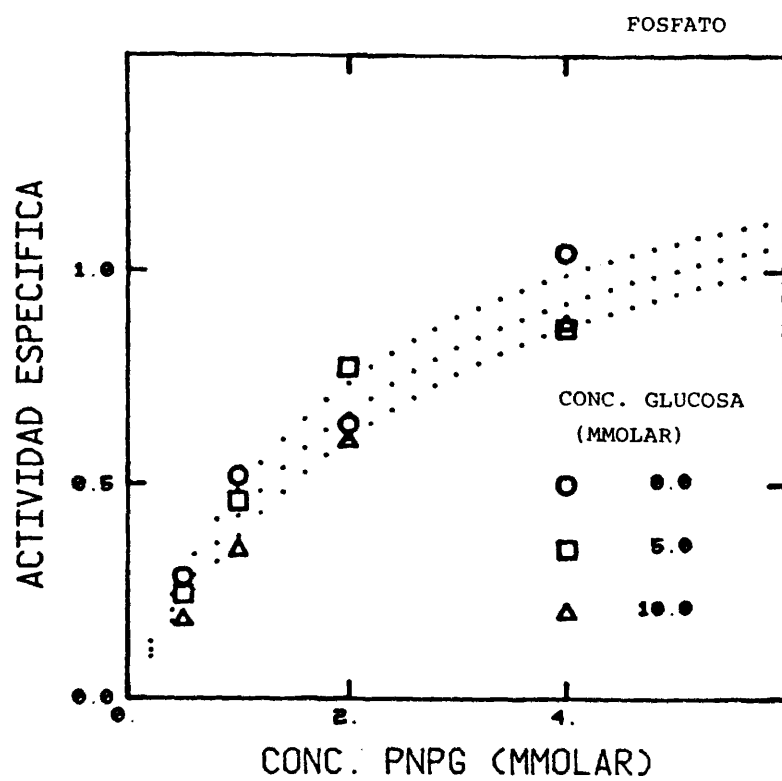


Figura 23: Actividad β -glucosidasa en Presencia de Fosforo Inorganico. Inhibicion in vitro por la Glucosa.

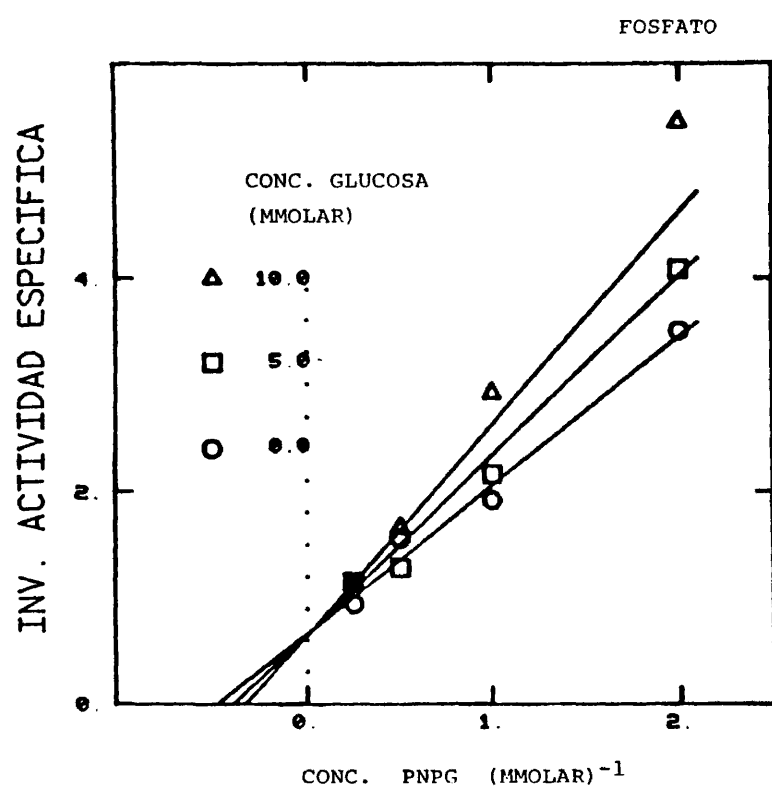


Figura 24: Diagrama de Lineweaver-Burk de la Actividad β -glucosidasa en Presencia de Fosforo Inorganico. Inhibicion in vitro por la Glucosa.

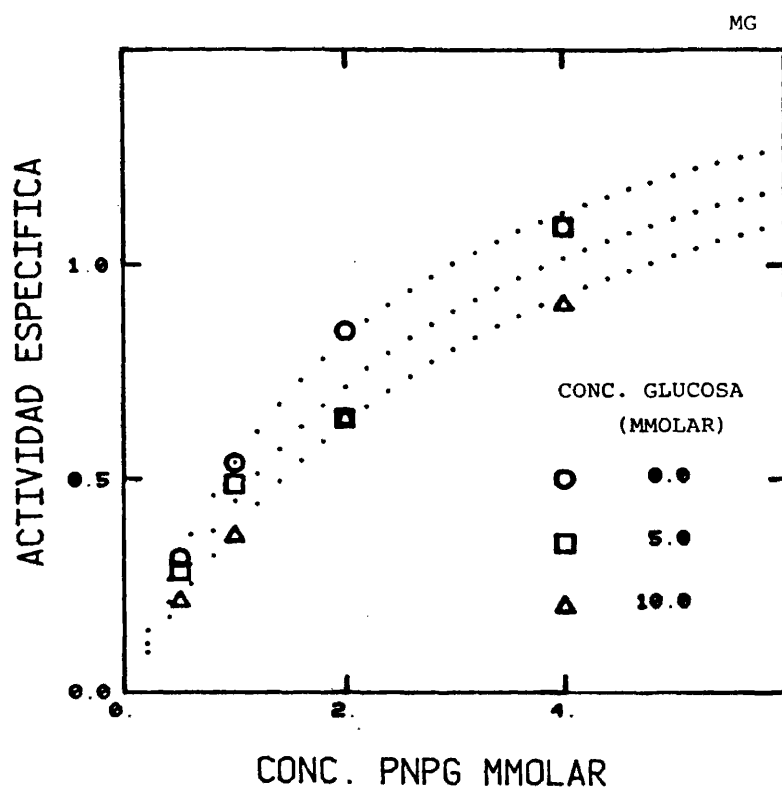


Figura 25: Actividad β -glucosidasa en Ausencia de Fosforo Inorganico
Inhibicion in vitro por la Glucosa.

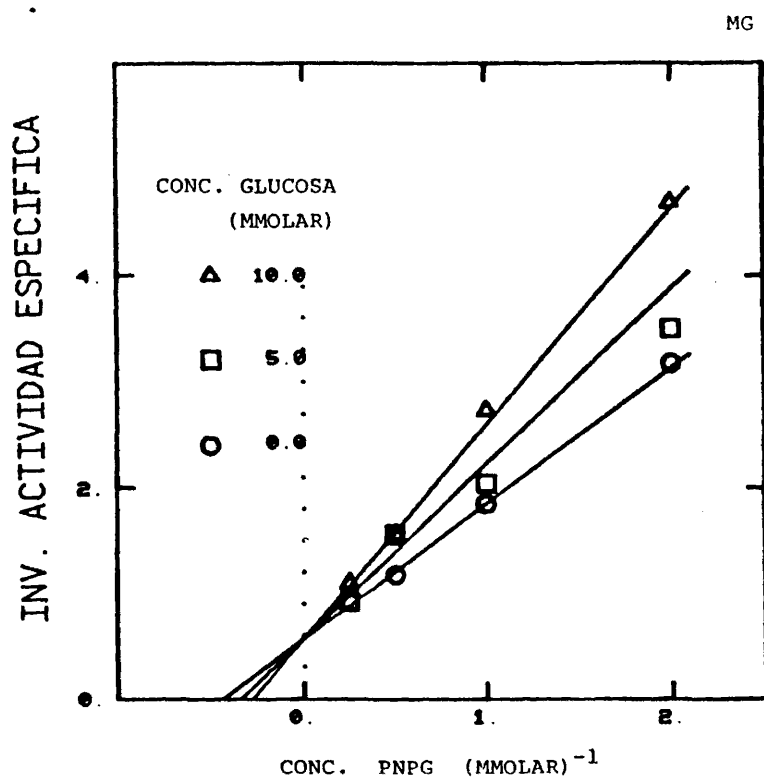


Figura 26: Diagrama de Lineweaver-Burk de la Actividad 8-glucosidasa en Ausencia de Fosforo Inorganico Inhibicion in vitro por la Glucosa.

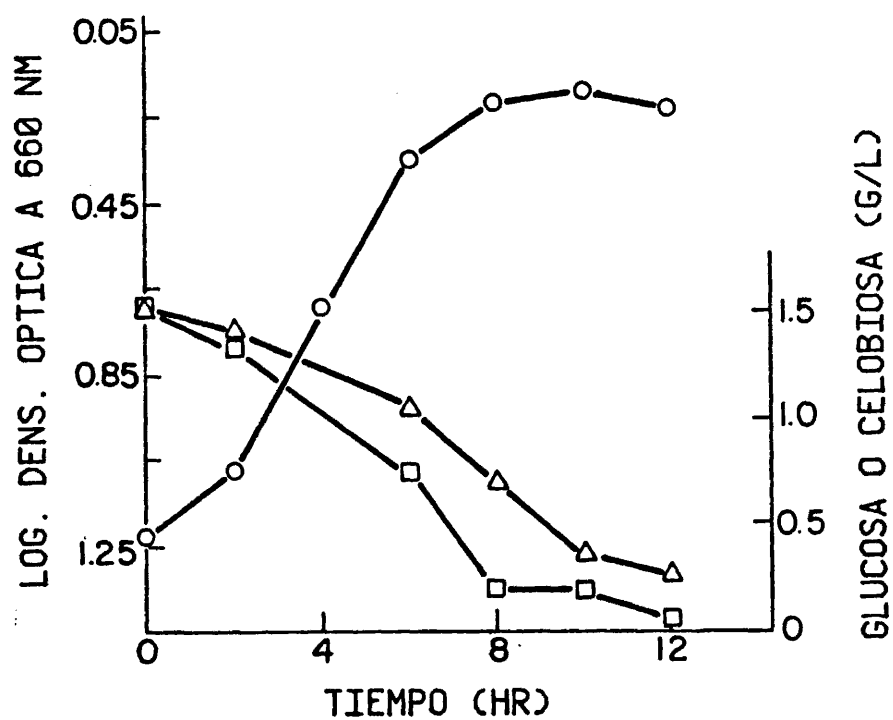


Figura 27: Crecimiento (○), Consumo de Glucosa (□) y Consumo de Celobios (Δ) por Cultivos de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptados a Crecer en Glucosa, Despues de Crecer Durante 100 Generaciones en Celobios.

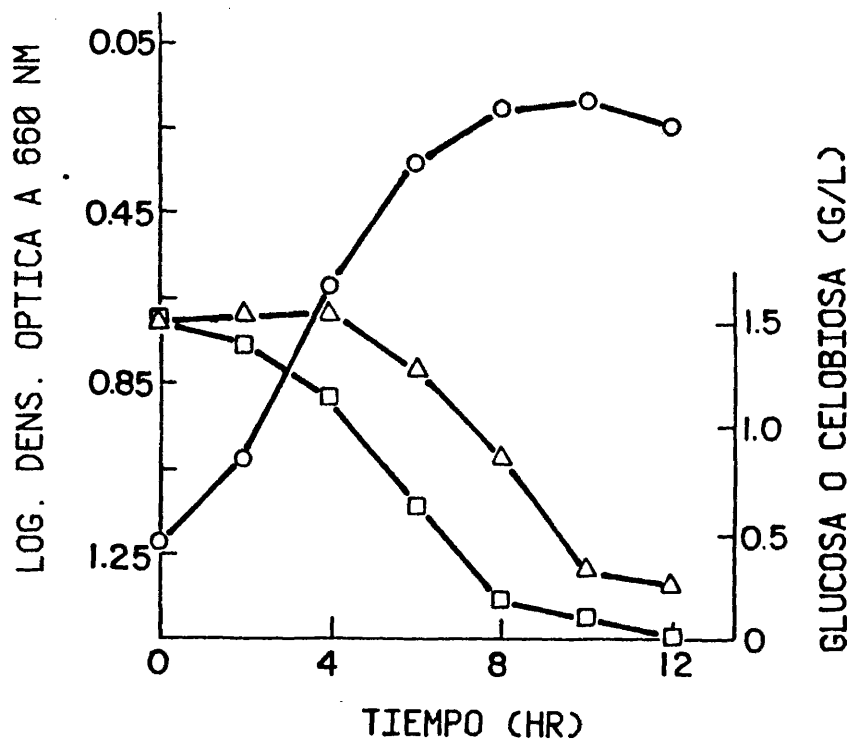


Figura 28: Crecimiento (O), Consumo de Glucosa (□) y Consumo de Celobiosa (Δ) por el Cultivo de la Figura 27 Después de Crecer Durante 15 Generaciones en Celobiosa.

con una mezcla de celobiosa y glucosa a la misma concentracion final de 1.5 g/l. De nuevo y como se observa en la Figura 18, estos cultivos utilizaron la glucosa preferentemente, pero sin embargo, no hay ninguna duda de que ambos azucares se estan utilizando simultaneamente.

E. Transporte de D-Glucosa en *C. thermocellum* ATCC-27405

El estudio de los mecanismos especificos involucrados en el transporte y en la utilizacion de la glucosa por *C. thermocellum* ATCC-27405, se inicio con dos objetivos en mente: primero, encontrar una explicacion razonable al hecho de que las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes fueran diferentes cuando el microorganismo crece en celobiosa o en glucosa y segundo, determinar el mecanismo especifico del transporte de la glucosa para luego estudiar su regulacion.

1. Incorporacion de D-Glucosa-(¹⁴C-U).

La incorporacion de glucosa en las celulas de *C. thermocellum*, se midio primero a una concentracion exogena de glucosa de 1mM. Las celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa pudieron incorporar la glucosa, pero las no adaptadas a crecer en este azucar no lo hicieron (Figura 29), el grado de incorporacion del azucar por estas ultimas siendo similar al de las celulas adaptadas a crecer en glucosa y muertas por la accion del calor. Esto demuestra, que la cantidad de glucosa asociada a estas celulas es consecuencia de la absorcion inespecifica a la superficie celular de la glucosa radioactivamente marcada.

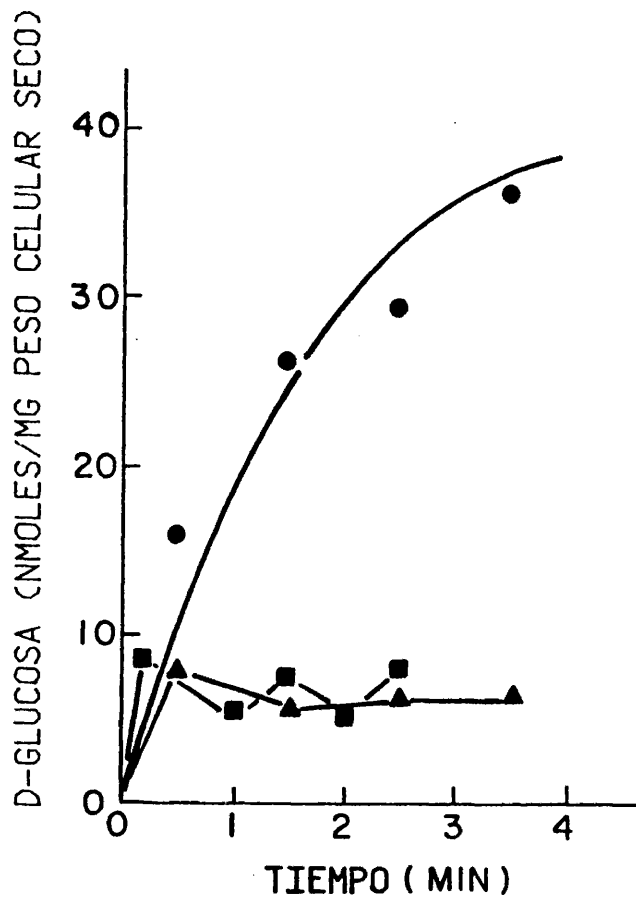


Figura 29: Incorporación de Glucosa por Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, a una Concentración Exógena de Glucosa de 1mM.
 (●) Celulas Adaptadas; (▲) Celulas No Adaptadas;
 (■) Celulas Adaptadas y Muertas por el Calor.

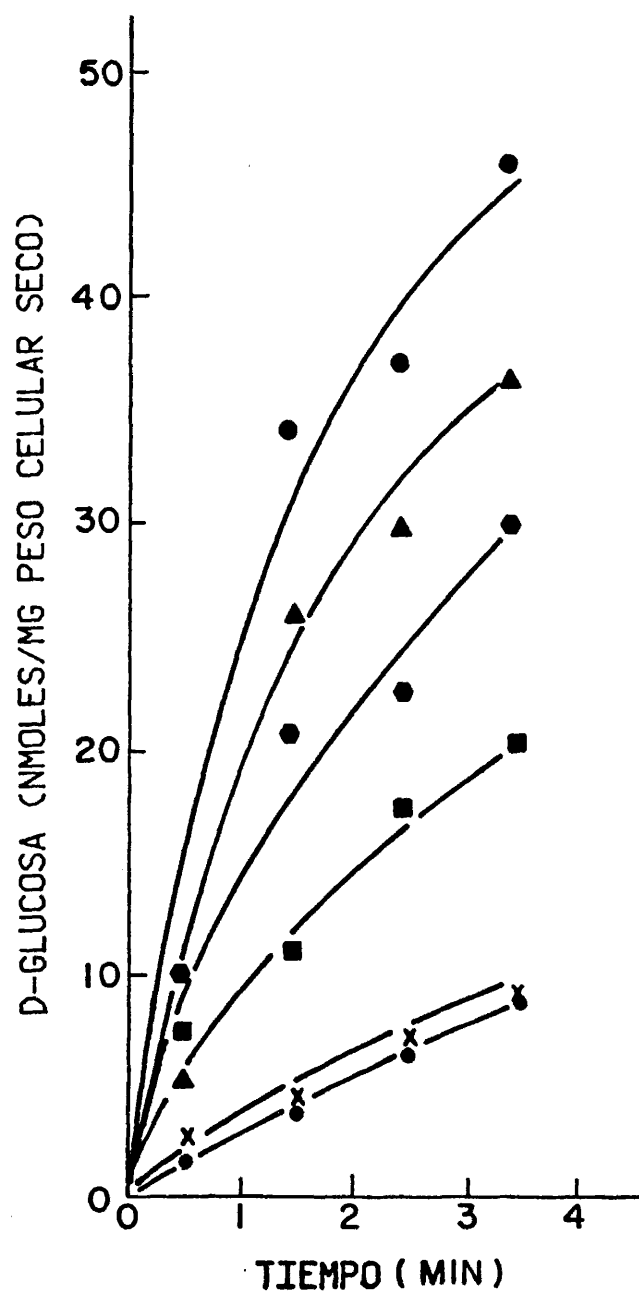
La Figura 30 muestra la incorporacion de glucosa por las celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en dicho azucar en presencia de varias concentraciones exogenas del mismo. Los valores experimentales se corrigieron con los debidos a la absorcion inespecifica. El correspondiente diagra de Lineweaver-Burk a partir de los datos de la Figura 30 se muestra en la Figura 31. Las velocidades iniciales de incorporacion de glucosa se calcularon a partir de los valores de incorporacion experimentales en los primeros 0.5 minutos. El sistema de incorporacion, transporte o utilizacion de glucosa por las celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en este azucar, tiene pues, una Vmax de 45 nanomoles de glucosa /min. x mg peso celular seco y una Km de 1.42×10^{-3} M.

Para comprobar como se comparan estos valores cineticos de incorporacion de glucosa en este tipo de celulas y bajo condiciones experimentales definidas con los valores cineticos de incorporacion de glucosa por las celulas de C. thermocellum que crecen en un medio complejo como el CM-4, se hizo un experimento, en el que estas celulas se crecieron en el medio de CM-4 que contenia glucosa a diferentes concentraciones.

La grafica de la Figura 32, muestra que las concentraciones exogenas variables de glucosa pueden modificar la velocidad de crecimiento. La saturacion se alcanzo a una concentracion exogena de glucosa de 12mM. En la Figura 33, el rendimiento celular (Y) de la glucosa fue de 0.161 gms de celulas por gramo de glucosa consumida. Finalmente, el diagrama de

Figura 30: Incorporación de Glucosa a Varias Concentraciones Exógenas. Los Valores Están Corregidos con los Debidos a la Absorción Inespecífica.

- (●) 0.1 mM
- (×) 0.2 mM
- (■) 0.5 mM
- (●) 1 mM
- (▲) 2 mM
- (●) 3 mM



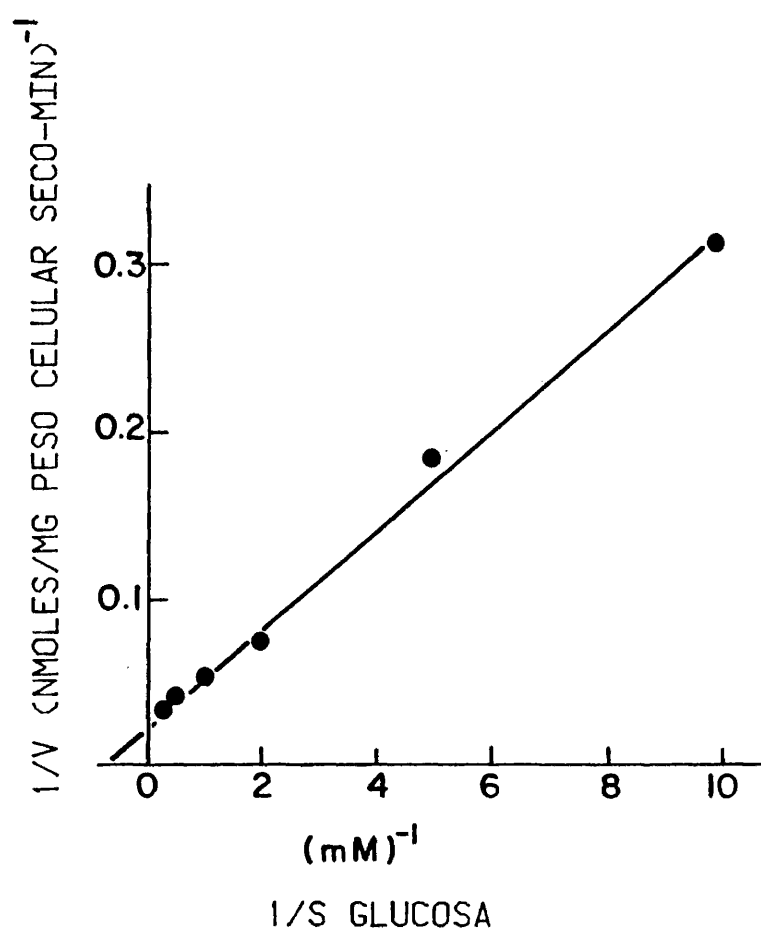


Figura 31: Diagrama de Lineweaver-Burk de la Velocidad Inicial de Incorporación de Glucosa.

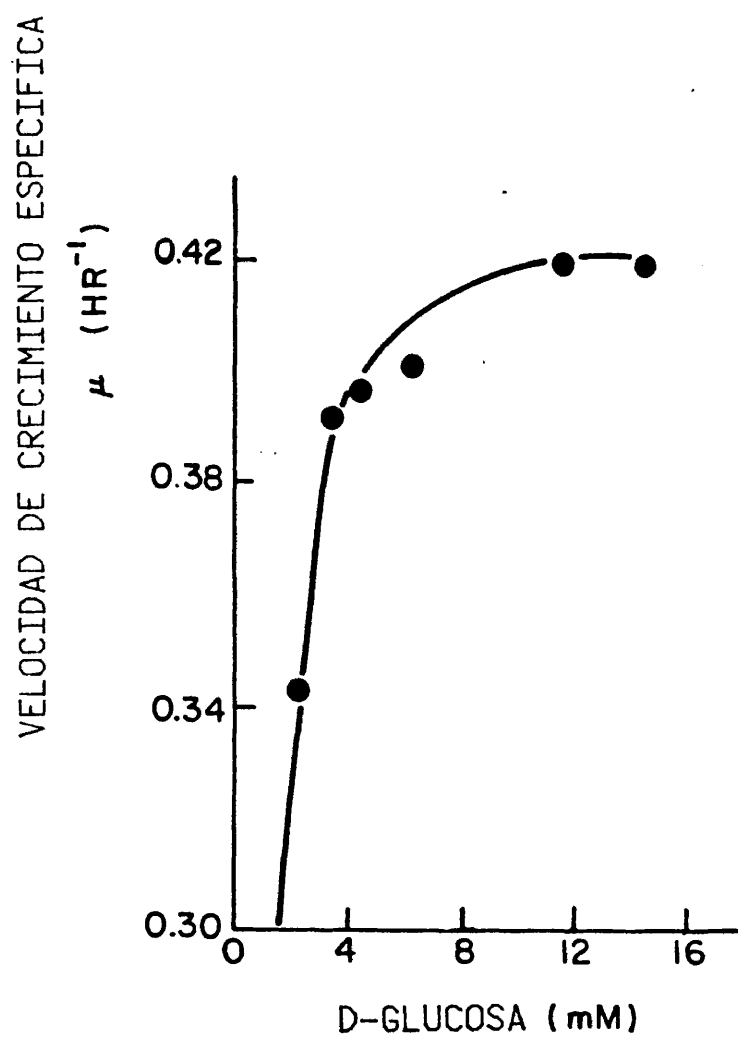


Figura 32: Velocidades de Crecimiento Especificas de Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa, al Crecer en Diversas Concentraciones de Esta Hexosa.

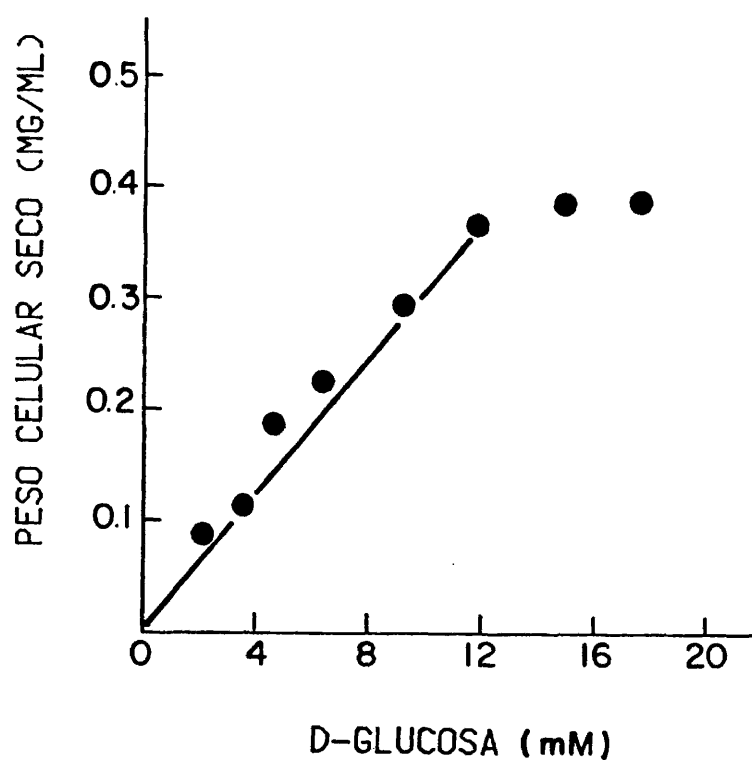


Figura 33: Rendimiento Celular de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptado a Crecer en Glucosa.

$K = \frac{\mu}{Y}$ frente a las concentraciones variables de glucosa nos permite calcular los parametros cineticos de la incorporacion in vitro de glucosa por este microorganismo (Figura 34). El sistema mostro una V_{max} de 242 nanomoles de glucosa./min. x mg peso celular seco y una K_m de $1.55 \times 10^{-3}M$.

Cuando se comparan ambos resultados se observa que la velocidad de incorporacion de la glucosa es 5.5 veces menor en nuestro ensayo in vitro que cuando las celulas crecen bajo condiciones anaerobicas normales en un medio completo. Sin embargo, las K_m 's son practicamente iguales lo que nos lleva a la conclusion de que el ensayo in vitro esta midiendo los mismos parametros de transporte que el ensayo in vitro, pero en aquel perdemos actividad debido probablemente a la degeneracion del sistema de transporte durante la preparacion y manejo de las celulas y a las dificultades tecnicas del mantenimiento de las condiciones anaerobicas durante el ensayo.

2. Actividades Glucoquinasa y PEP-PTS

Los resultados preliminares de resumen en la Tabla XXXII. Lo interesante de los valores obtenidos, es el hecho de que existe casi la misma actividad glucoquinasa en las celulas adaptadas a crecer en la glucosa que en las que requieren un periodo de latencia extenso para crecer en este azucar. Es evidente que aunque las celulas salvajes de C. thermocellum poseen una enzima capaz de fosforilar la glucosa, no

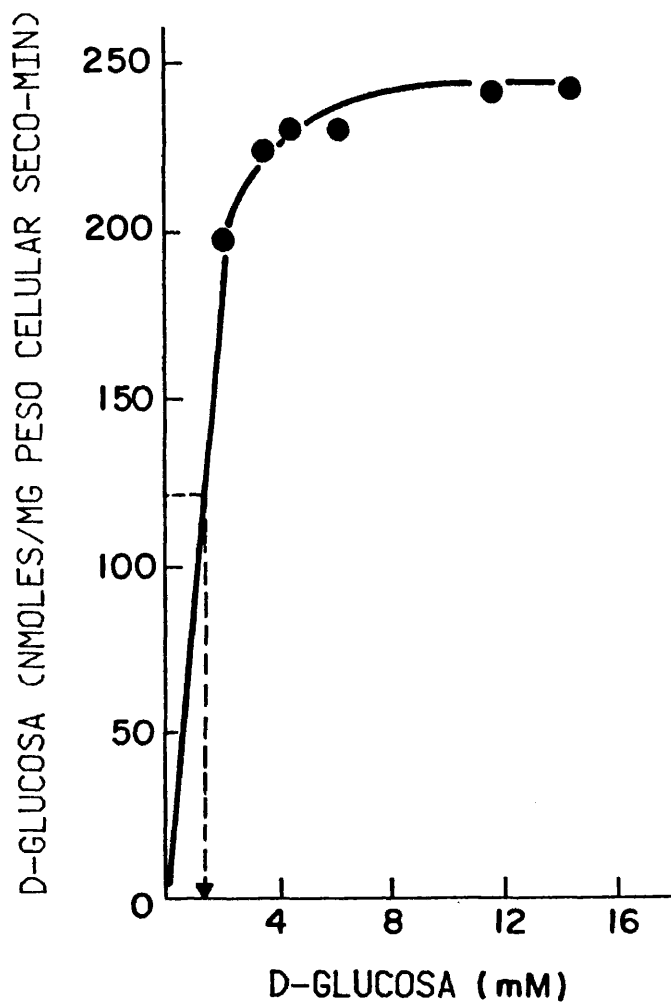


Figura 34: Asimilacion de Glucosa en Funcion de su Concentracion Extracelular por Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Esta Hexosa.

TABLA XXXII

Actividades de las Enzimas Presuntamente Implicadas en la Utilización de Azúcares por C. thermocellum ATCC-27405

<u>Actividad</u>	<u>Celulas No Adaptadas</u>	<u>Celulas Adaptadas</u>
Glucoquinasa ¹	0.020	0.019
PEP-Fosfotransferasa ²	ND	NM

1. En micromoles de NADPH producido/min. x mg proteína

2. En micromoles de NAD⁺ producido/min. x mg proteína

ND - No se hizo

NM - La actividad no se detectó.

pueden utilizar este azucar si no hasta que ha ocurrido un periodo de latencia extenso. Se puede concluir entonces, que la enzima glucoquinasa no es el factor limitante en la utilizacion de la glucosa por las celulas de este microorganismo no adaptadas a crecer en glucosa.

Sin embargo, utilizando un ensayo espectrofotometrico (Slee y Tanzer, 1979), no fue posible demostrar definitivamente la existencia de un sistema PEP-PTS (fosfoenolpinerato-fosfotransferasa) para el transporte de celobiosa o de glucosa por la celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en este azucar (Tabla XXXII).

3. Efecto de Diferentes Inhibidores en el Crecimiento "In vivo" de *C. thermocellum* en Celobiosa y en Glucosa

El analisis cinetico de la velocidad inicial de la incorporacion de glucosa en las celulas de *C. thermocellum* adaptadas a crecer en esta hexosa dio una linea recta (Figura 31), lo que sugiere la presencia de un sistema de transporte para este azucar, activo, saturable y unico.

El objetivo de los experimentos siguientes fue el encontrar la conexion entre el compuesto quimico donador de energia y el sistema enzimatico de transporte activo.

La Tabla XXXIII muestra el efecto de diferentes inhibidores sobre el crecimiento in vivo de las celulas de *C. thermocellum*, adaptadas o no adaptadas a crecer en glucosa, en un medio complejo como el CM-4 adicionado de glucosa o de celobiosa como fuentes de carbono. El Fluoruro de Sodio

Efecto de Diferentes Inhibidores en el Crecimiento In Vivo de Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405 Adaptadas a Crecer en Glucosa, Cuando Crecen en Celobiosa o en Glucosa. Valores de Inhibicion en %

Inhibidor	Sustrato	Concentracion de Inhibidor (M)									
		5×10^{-2}	1×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-3}	2×10^{-3}	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-5}	2×10^{-5}	1×10^{-6}
NaF	G	100	100								
Na_2HASO_4	G	100	53	20							
DNP	G			100		91.2		94.4		9.6	
	Cb			100		90		66		6.8	
CCCP	G		100		100		94		4.8		
	Cb		100		100		60		6.8		
CCCP en	G				100		68		8		8.2
Etanol	Cb				100		55		12.4		6.8
DCCD	G		100		66		14.2		3.4		

DNP = 2,4-dinitrofenol
CCCP = Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
DCCD = N,N'-diciclohexilcarbodiimida
% Inhibition = $\text{Co-C/Co} \times 100$
Co = D.O. final a 660 nm de los cultivos no inhibidos (control)
C = D.O. final a 660 nm de los cultivos inhibidos.

y el Arsenato Sodico son inhibidores de la sintesis del ATP, el 2,4-dinitrofenol y la Carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona son agentes desacopladores y la N-N'-diciclohexilcarbodiimida es un inhibidor de la enzima ATPasa. Como puede apreciarse a partir de esta Tabla se obtienen las concentraciones de inhibidores que inhiben en un 100% el crecimiento in vivo de este microorganismo en un medio complejo; los resultados no son significativamente diferentes cuando el microorganismo crece en celobiosa o en glucosa.

4. Efecto de los Inhibidores de la Sintesis del ATP en la Incorporacion de Glucosa por Celulas de *C. thermocellum* Adaptadas a Crecer en la Glucosa

A partir del experimento anterior se pueden conocer las concentraciones de los inhibidores de la sintesis del ATP que inhiben el crecimiento de este microorganismo en un medio complejo como el CM-4. En el siguiente experimento se intento determinar si las concentraciones del inhibidor que detienen el crecimiento de estas celulas en un medio complejo tambien impiden la incorporacion de glucosa por las celulas de este microorganismo mantenidas en un sistema experimental definido.

En tubos de Hungate que contenian un volumen adecuado de la solucion buffer y una concentracion conveniente de los inhibidores FNa o ASO_4HNa_2 se pipeto una concentracion adecuada de celulas de *C. thermocellum* adaptadas a crecer en glucosa. Las celulas se mantuvieron durante 8 minutos a 60°C y seguidamente se estimo cuantitativamente la glucosa incorporada despues

de añadir una concentracion adecuada de glucosa radioactiva a la solucion buffer. Los valores de incorporacion de glucosa por estas celulas en presencia y en ausencia de estos inhibidores se muestran en las Figuras 35 y 36.

La accion de estos dos inhibidores, expresada como "tanto por ciento de inhibicion" del crecimiento del microorganismo in vivo y de la incorporacion de glucosa in vitro, se muestran en la Tabla XXXIV de acuerdo con la concentracion efectiva de inhibidor por mg de peso celular seco en ambos sistemas. Como puede observarse, practicamente las mismas concentraciones efectivas del inhibidor que detienen el crecimiento de las celulas in vivo interfieren con la incorporacion de glucosa in vitro.

Por lo tanto, la inhibicion de la incorporacion de glucosa ejercida por el fluoruro y el arsenato se puede tomar como evidencia presuntiva de que en este microorganismo el transporte activo de glucosa depende de la hidrolisis de las moleculas que contienen grupos fosfato.

5. Efecto del Inhibidor 2,4-dinitrofenol (DNP), en la Incorporacion de Glucosa por C. thermocellum ATCC-27405

Del experimento anterior se puede extraer la conclusion de que el transporte activo de la glucosa en este microorganismo depende de la energia de hidrolisis de las moleculas que contienen grupos fosfato.

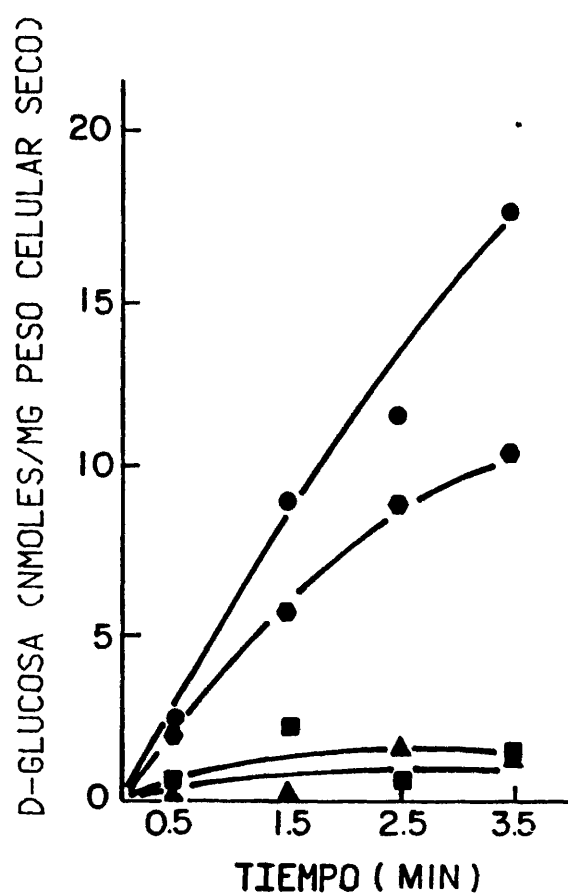


Figura 35: Incorporación de Glucosa por las Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa. Los Valores han sido Corregidos con los Debidos a la Absorción Inespecífica.

- (●) en ausencia de FNa
- (●) con 1×10^{-3} M FNa
- (■) con 1×10^{-2} M FNa
- (▲) con 5×10^{-2} M FNa

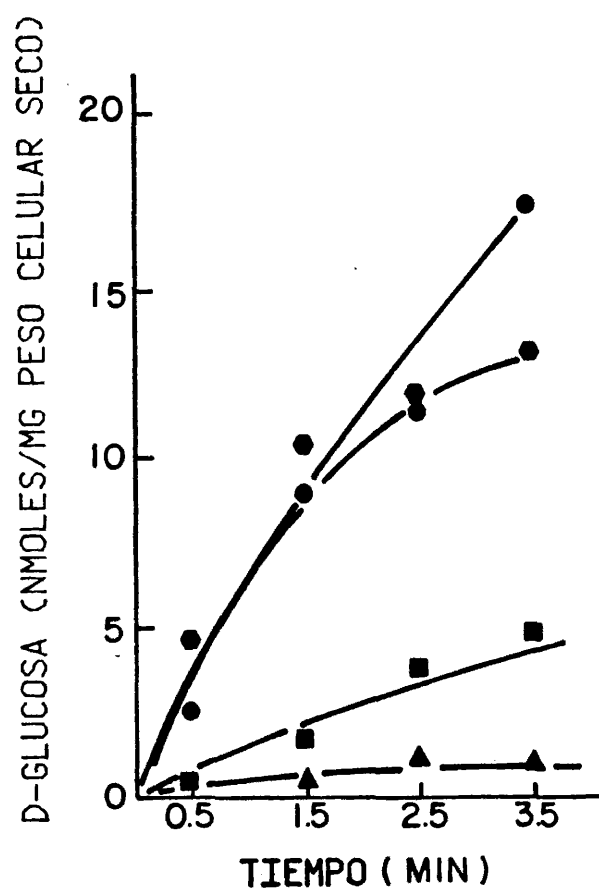


Figura 36: Incorporación de Glucosa por Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa. Los Valores han sido Corregidos con los Debidos a la Absorcion Inespecifica.

- (●) en ausencia de ASO_4HNa_2
- (●) con $1 \times 10^{-3} \text{ M ASO}_4\text{HNa}_2$
- (■) con $1 \times 10^{-2} \text{ M ASO}_4\text{HNa}_2$
- (▲) con $5 \times 10^{-2} \text{ M ASO}_4\text{HNa}_2$

TABLA XXXIV

Efecto del FNa y ASO_4HNa_2 en el Crecimiento in vivo y en la Incorporacion de Glucosa in vitro de Celulas de C. thermocellum ATCC-27405 Adaptadas a Crecer en Glucosa

(A) "IN VIVO"

<u>% Inhibicion del Crecimiento</u>	<u>Compuesto</u>	<u>Concentracion (M)</u>	<u>Concentracion Efectiva de Inhibidor (mmoles/mg peso cel. seco)</u>
100	FNa	5×10^{-2}	410
100	"	1×10^{-2}	83
0	"	1×10^{-3}	8.3
100	ASO_4HNa_2	5×10^{-2}	410
53	"	1×10^{-2}	83
20	"	1×10^{-3}	8.3

(B) "IN VITRO"

90	FNa	5×10^{-2}	220
91.2	"	1×10^{-2}	44
32	"	1×10^{-3}	4.4
91.8	ASO_4HNa_2	5×10^{-2}	220
73	"	1×10^{-2}	44
0	"	1×10^{-3}	4.4

Sin embargo, lo que no esta claro es si esta energia se usa en forma de un complejo permeasa-ATP o si se emplea en la creacion de una fuerza motriz PMF, debida a la accion de una ATPasa activa. Tambien, el PEP (fosfoenolpirurato) como molecula donadora de energia que es puede mediar en el transporte de la glucosa via un sistema PEP-PTS.

Las celulas de C. thermocellum, adaptadas a crecer en glucosa, se inocularon en el buffer citado anteriormente y se mantuvieron con el DNP durante 8 minutos antes de que se añadiese glucosa a la reaccion. Los valores de incorporacion de glucosa, en la presencia y en ausencia del DNP se muestran en la Figura 37.

La Tabla XXXV muestra, que las concentraciones de inhibidor que afectan en un 94.4% al crecimiento de este microorganismo in vivo solo afectan en un 16.2 a la incorporacion de la glucosa in vitro (y aun esto puede ser a consecuencia de la disminucion de las reservas de ATP intracelular debido a la incubacion previa de las celulas con el DNP).

En cualquier caso, puede observarse que la incorporacion de glucosa no se inhibe en un 100% a las concentraciones de inhibidor que detienen completamente el crecimiento de estas celulas in vivo, lo cual sugiere claramente que la fuerza motriz PMF no es la fuente de energia del transporte activo de la glucosa en este microorganismo.

6. Incorporacion y Fosforilacion de la α MG por las Celulas de C. thermocellum ATCC-27405

De los experimentos realizados anteriormente, se deduce que la energia de hidrolisis de las moleculas que contienen grupos fosfato se necesita

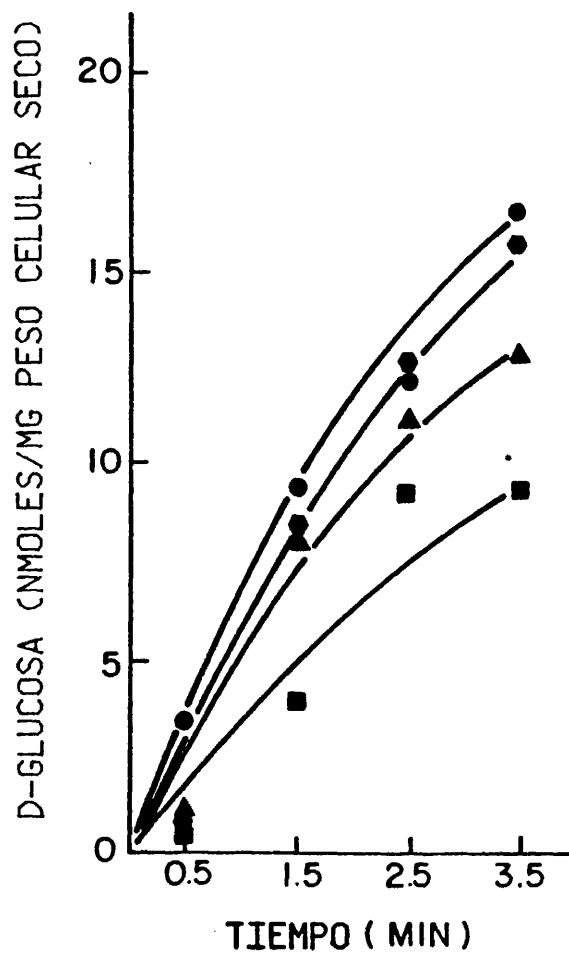


Figura 37: Incorporación de Glucosa por Celulas de *C. thermocellum* ATCC-27405, Adaptadas a Crecer en Glucosa. Los Valores han sido Corregidos con los Debidos a la Absorción Inespecífica.

- (●) en ausencia de DNP
- (■) con 2×10^{-2} M DNP
- (◊) con 2×10^{-3} M DNP
- (▲) con 2×10^{-4} M DNP

TABLA XXXV

Efecto del DNP en el Crecimiento in vivo y en la Incorporacion de Glucosa in vitro por Celulas de C. thermocellum Adaptadas a Crecer en Glucosa

(A) "IN VIVO"

<u>% Inhibicion del Crecimiento</u>	<u>Compuesto</u>	<u>Concentracion (M)</u>	<u>Concentracion Efectiva de Inhibidor (moles/mg peso cel.seco)</u>
100	DNP	2×10^{-2}	480
91.2	"	2×10^{-3}	48
94.4	"	2×10^{-4}	4.8

(B) "IN VITRO"

49	DNP	2×10^{-2}	48
16.2	"	2×10^{-3}	4.8
26.4	"	2×10^{-4}	0.48

para el transporte activo de glucosa en este microorganismo. Sin embargo, la fuerza motriz PMF no parece ser el sistema donador de energía para este transporte activo.

Para diferenciar en el transporte activo de la glucosa entre los sistemas permeasa-ATP y PEP-PTS se midió en las células de C. thermocellum adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa el transporte y la fosforilación de la α MG (α -metil glucosa). Este azúcar es un análogo no metabolizable de la glucosa y un sustrato característico de los sistemas PEP-PTS.

El transporte de α MG se midió indirectamente, por su efecto en la velocidad de crecimiento de las células de C. thermocellum creciendo en un medio complejo como el CM-4, o cuantificando directamente su incorporación in vitro en sistemas experimentales definidos. Los resultados obtenidos (Tabla XXXVI) muestran que la α MG no interfiere con el crecimiento en glucosa o en celobiosa de las células de C. thermocellum adaptadas y no adaptadas a crecer en este azúcar. Esto sugiere que las células de C. thermocellum no transportan la α MG.

En la Figura 38, se muestra la incorporación de α MG por las células de C. thermocellum, adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa. La incorporación de glucosa por estas mismas células se utilizó como control experimental. Los valores experimentales de incorporación no se corrigieron con los debidos a la absorción inespecífica. Como se puede observar, los valores de incorporación obtenidos con las células adaptadas a crecer en glucosa son similares a los alcanzados con las células no adaptadas a crecer en este azúcar, lo que sugiere una vez más que la α -MG no se transporta al interior de las células.

TABLA XXXVI

Efecto de α MG en el Crecimiento In vivo de C. Thermocellum
ATCC-27405, Adaptado a Crecer en Glucosa

<u>Concentracion</u> <u>Inhibidor</u>	<u>% Inhibicion</u>	
	<u>Celulas Adaptadas</u> <u>que Crecen en</u> <u>Glucosa (8mM)</u>	<u>Celulas No Adptadas</u> <u>que Crecen en</u> <u>Celobiosa (8mM)</u>
1.2 mM	0	0
2.5 mM	0	0
5.1 mM	0	0
15.4 mM	0	0
30.8 mM	0	0

$$\% \text{ Inhibicion} = C_0 - C / C_0 \times 100$$

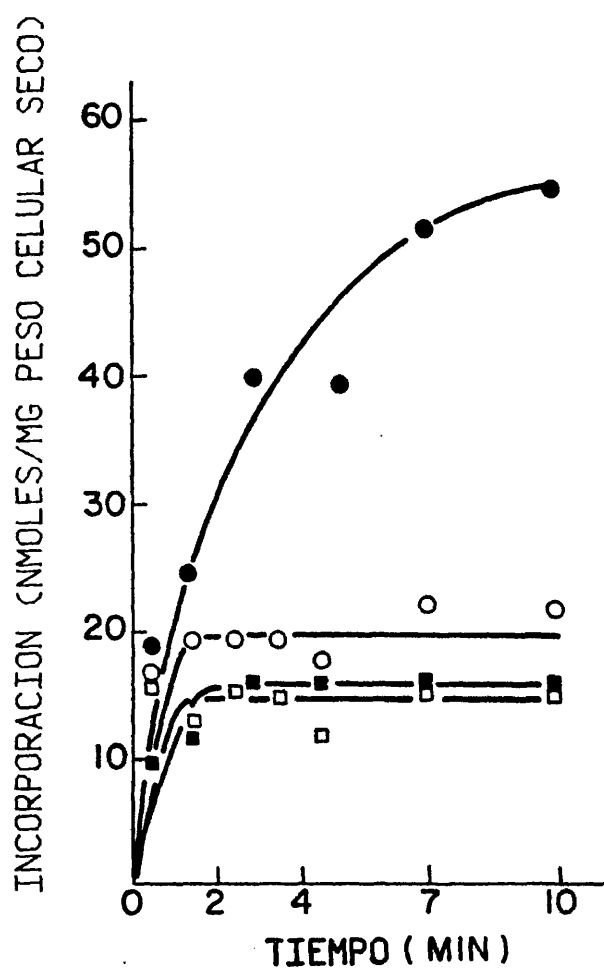
C_0 = D.O. final a 660nm de los cultivos no inhibidos

C = D.O. final a 660nm de los cultivos inhibidos.

Figura 38: Incorporacion de Glucosa y α -MG a una Concentracion Exogena de 1mM.

- (●■) celulas adaptadas
- (○□) celulas no adaptadas
- (●○) incorporacion de D-glucosa
- (■□) incorporacion de α MG

Los Valores No Estan Corregidos con los Debidos a la Absorcion Inespecifica.



Sin embargo, se pueden hacer objeciones a estos dos experimentos.

En el primer experimento, puede argumentarse que el sistema de incorporacion de la glucosa tiene una mayor afinidad por la glucosa que por la α MG lo que hace altamente improbable el transporte de α MG y en el segundo experimento, que la concentracion intracelular del PEP de estas celulas es tan bajo, que es insuficiente para mediar este transporte de α MG.

Para evitar los problemas citados anteriormente, se recurrio a un sistema de analisis experimental en el que las celulas estan permeabilizadas, favoreciendo asi, el paso libre de los sustratos a traves de la membrana celular y permitiendo al mismo tiempo que las moleculas donantes de energia se añadan selectiva e individualmente a la mezcla reaccionante y esten presentes en exceso durante el tiempo de la reaccion. Las celulas se permeabilizaron con tolueno: acetona (1:4; v/v) a una concentracion final del 1% y luego se incubaron 20 min. a 60°C con los azucares correspondientes y con ATP, PEP o ninguno de ellos. Cuando termino el tiempo de reaccion, las celulas se eliminaron por centrifugacion a 15,000 x g durante 5 min. y se determino en el liquido sobrenadante la concentracion de azucares fosforilados mediante el uso de filtros anionicos de papel. En ninguno de los azucares fosforilados se pudo detectar un nivel significativo de fosforilacion (Tabla XXXVII). Es posible, sin embargo, que las celulas no estuviesen completamente permeabilizadas, o que como en el caso de la glucosa, esta se metabolizase completa y rapidamente con lo que no se pueden acumular los compuestos fosforilados.

TABLA XXXVII

Fosforilación *in vitro* de la Glucosa, 2-DOG y α MG en Celulas Permeabilizadas de *C. thermocellum* ATCC-27405 en Presencia de 10mM ATP, 10mM PEP o Ninguno de Ellos

Control No Celulas	No Donor de Energia	Con ATP	Con PEP
<u>14C-Glucosa-P (CPM)</u>			
12,166	7,640	15,186	18,285
9,504	17,984	8,167	9,976
16,250	14,653	7,565	14,100
	15,499	9,965	12,942
<u>14C-Deoxyglucosa-P (CPM)</u>			
7,155	5,541	4,273	2,960
11,831	2,563	3,802	6,165
5,430	57,425	2,985	2,990
	4,948	2,600	4,823
<u>14C-αMG-P (CPM)</u>			
6,357	1,554	1,876	3,752
5,048	4,621	3,315	4,540
5,470	4,353	2,800	2,677
	13,426	2,782	4,852

* Las cifras corresponden a fracciones de 0.050 ml tomadas de las mezclas reaccionantes.

7. Determinacion de la Fosforilacion "in vitro" de la D-Glucosa en Celulas Permeabilizadas de *C. thermocellum* ATCC-27405, con la Ayuda de un Metodo para Determinar la Actividad Glucoquinasa

Para eliminar todos los problemas formulados anteriormente, se analizo la relacion entre la fuente de energia y transporte de la glucosa con la ayuda de celulas permeabilizadas y de un metodo de estimacion de la actividad glucoquinasa. En este sistema, las celulas se permeabilizaron de nuevo con tolueno: acetona (1:4;v/v) a una concentracion final del 1% y seguidamente se midio la aparicion de glucosa-6-fosfato en el medio extracelular. En este sistema, solo se puede emplear como sustrato la glucosa ya que el ensayo esta basado en la oxidacion de la glucosa-6-fosfato a fosfogluconato con la reduccion consiguiente del NADP^+ a NADPH, cuya aparicion en el medio se sigue espectrofotometricamente a 340 nm.

Como se observa en la Tabla XXXVIII, la fosforilacion de la D-glucosa solo tiene lugar cuando hay ATP como donador de energia en el medio extracelular.

Este experimento es definitivo por si mismo y complementa a todos los demas. Esta claro que el PEP (fosfoenolpiruvato) no puede fosforilar a la D-glucosa en las celulas permeabilizadas de *C. thermocellum*, eliminando asi la posibilidad de la existencia de un sistema PEP-PTS para el transporte de este azucar. Al mismo tiempo, este resultado apoya fuertemente (por eliminacion de alternativas) la afirmacion de que el transporte de la glucosa en este microorganismo esta mediado por un sistema permeasa-ATP.

TABLA XXXVIII

Determinación de la Fosforilación in vitro de la Glucosa, en
 Celulas Permeabilizadas de C. thermocellum ATCC-27405, con
 Ayuda de un Metodo de Estimación de la Actividad Glucoquinasa

<u>Donador de Energia</u>	<u>ΔAbsorbancia</u>	<u>ΔAb/min.</u>	<u>Actividad</u>	<u>Actividad Especifica</u>
Sin Donador	0.000	-	-	-
PEP, 10mM	0.000	-	-	-
ATP, 10mM	0.053	0.0058	0.00282	0.0928

Actividad especifica, en micromoles de NADPH producidos/min. x mg
 proteina

Absorbancia en unidades de absorbancia

Actividad, en micromoles de NADPH producidos/min. x ml de mezcla
 reaccionante.

VI. DISCUSION

A. Evaluacion de las Cepas de C. thermocellum y de los Microorganismos del Grupo HG por su Capacidad de Producir Etanol y Enzimas con Actividades Hidroliticas

Para valorar el potencial de C. thermocellum como productor de etanol, todas las cepas disponibles de este microorganismo al comienzo de esta investigacion se evaluaron de acuerdo con su cinetica de crecimiento en varios sustratos, produccion de etanol y resistencia frente al etanol.

La Tabla VIII muestra que de todas las cepas de C. thermocellum, la ATCC-27405 fue la de crecimiento mas rapido y prolifico en celobiosa, tanto en terminos de concentraciones finales mayores de celulas, como en tiempos de duplicacion menores. Solo tres cepas crecieron en D-xilosa (Tabla IX). Ya que estas cepas estaban descritas como incapaces de utilizar las pentosas, se penso que o estabamos en presencia de unas pocas celulas mutantes capaces de crecer en xilosa, o que los cultivos estaban compuestos por una poblacion microbiana mixta. Usando procedimientos de aislamiento standard, principalmente morfologia de las colonias y capacidad de crecimiento en diferentes azucares, se aislaron tres nuevos microorganismos que se denominaron HG1, HG2 y HG3. Estos microorganismos crecieron en xilano, D-xilosa, celobiosa y D-glucosa, pero no en celulosa Solka Floc. Un estudio mas detallado de estos microorganismos por otro grupo de investigadores de nuestro laboratorio, (B. Snedecor, 1981, comun. personal) revelo que tenian algunas propiedades comunes con el Clostridium thermosaccharolyticum.

La Tabla X muestra el comportamiento de todos los microorganismos inoculados en xilano. Ninguna de las cepas de C. thermocellum crecio en el xilano. Sin embargo, los microorganismos del grupo HG si lo hicieron. Es interesante el hecho de que la densidad optica de los medios de cultivo inoculados con las cepas de C. thermocellum disminuyo en un 50%. Esto podria deberse a la degradacion del xilano por las celulosas inespecificas producidas por C. thermocellum e introducidas en los medios de cultivo con el inoculo o, por sintesis de novo, debida a un crecimiento limitado de las celulas en el medio complejo CM-4. De cualquier forma es claro que C. thermocellum no puede utilizar para crecer los productos de degradacion del xilano debido probablemente a la falta de los mecanismos de transporte adecuados. La Tabla XI muestra el crecimiento de los microorganismos del grupo HG en D-xilosa y en celobiosa. El microorganismo HG3 crecio pobremente en la celobiosa pero bien en la xilosa.

La produccion de etanol por estos microorganismos se cuantifico empleando celobiosa como sustrato. La Tabla XII muestra que del grupo C. thermocellum, la cepa ATCC-27405 es la mejor productora de etanol, tanto en terminos de maxima concentracion final de etanol, como de maxima velocidad especifica de formacion. Los microorganismos del grupo HG produjeron el doble de etanol a velocidades especificas de formacion mucho mas rapidas. De hecho estos microorganismos son tambien capaces de producir etanol a partir del xilano, D-xilosa y D-glucosa (Tablas XIII, XIV y XV).

La concentracion final de etanol en el medio de cultivo puede no solo inhibir el crecimiento, sino limitar la concentracion final de etanol producida por estos microorganismos. La Tabla XVI pone de manifiesto que cada microorganismo tiene una sensibilidad diferente frente al etanol. Del grupo de C. thermocellum, la cepa ATCC-27405 es la mas resistente a la inhibicion por el etanol, pero los microorganismos del grupo HG lo son aun mas.

Seguidamente, se determino la capacidad de estos microorganismos de degradar las fracciones celulosa y hemicelulosa presentes en los sustratos celulosicos complejos.

De la Tabla XVII se puede concluir que C. thermocellum posee enzimas capaces de degradar el xilano (actividad xilanasa), pero desgraciadamente este microorganismo no crece en los productos finales de la hidrolisis del xilano.

La Tabla XVIII pone de manifiesto que el microorganismo HG2, aunque es incapaz de crecer en celulosa, posee proteinas extracelulares con actividades CMCase y Xilanasa. Sin embargo, estas actividades enzimaticas son significativamente mucho mayores cuando el microorganismo crece en xilano que cuando lo hace en celobiosa, D-glucosa o D-xilosa. Esto indica que la sintesis de estas enzimas es inducible cuando el microorganismo crece en xilano ("induction"), pero es inhibida ("feed-back repression") cuando el microorganismo crece en celobiosa, glucosa o xilosa.

El efecto de la fuente de carbono en la expresion de las actividades enzimaticas extracelulares tambien se analizo durante el crecimiento en diferentes sustratos de las dos cepas de C. thermocellum, ATCC-27405 y LQ8. La Tabla XX muestra que estas cepas aunque no crecen en el xilano poseen proteinas extracelulares con actividades FPasa, CMCasa y Xilanasa. Sin embargo, a diferencia del microorganismo HG2, estas enzimas se produjeron constitutivamente y su sintesis no estuvo sometida a represion ("feed-back represion") por la celobiosa o la glucosa. Otros investigadores han demostrado que la actividad de estas enzimas tampoco esta sometida a inhibicion ("feed-back inhibition") por la celobiosa o la D-glucosa (Garcia et.al., 1980).

B. Utilizacion de Carbohidratos por C. thermocellum ATCC-27405

C. thermocellum ATCC-27405 crece en los monosacaridos D-glucosa y D-fructosa. Tambien lo hace en el disacarido celobiosa y en el polisacarido celulosa, pero no crecio en otras hexosas analizadas, como manosa, galactosa, sacarosa y lactosa o en azucar alcoholes como manotol e inositol. Ninguna de las pentosas analizadas, D-xilosa, D-arabinosa, D-arabinosa y xilano soporto el crecimiento de este microorganismo .

La Figura 7 muestra el crecimiento de C. thermocellum ATCC-27405 en D-glucosa. Antes de que tuviera lugar el crecimiento en esta hexosa se aprecio un largo periodo de latencia. Las concentraciones

•

finales de células y la velocidad de crecimiento fueron menores cuando el microorganismo creció en glucosa que cuando lo hizo en celobiosa. Por crecimientos sucesivos en glucosa se obtuvieron células "adaptadas a crecer en glucosa" que ya no mostraron más un período de latencia para iniciar su crecimiento en dicho azúcar, pero cuyas concentraciones finales de células fueron menores cuando crecieron en glucosa que al hacerlo en celobiosa (Figura 8).

La causa de un período de latencia tan extenso como el observado antes de que las células de C. thermocellum empiecen a crecer en glucosa, puede radicar hipotéticamente en la presencia en la población original de unas pocas células mutantes capaces de crecer en glucosa, a la pérdida de viabilidad y/o de esporulación de las células en presencia de esta hexosa, o en el tiempo requerido para la expresión de enzimas inducibles.

Que el crecimiento en glucosa no se debe a la presencia en la población original de unas pocas células mutantes capaces de crecer en glucosa, lo demuestran los datos de la Tabla XXIII. Estos resultados demuestran, que una gran proporción de células (20-40%) que nunca antes se habían expuesto a crecer en glucosa, se desarrollaron en esta hexosa. Mas aun, si se tiene en cuenta la eficiencia de la glucosa (Tabla XXIII) para soportar el crecimiento de estas células, debe concluirse que todas las células no adaptadas a crecer en este azúcar tienen la capacidad de crecer en glucosa,

pero antes de que estas células crezcan por primera vez en la glucosa se observa un periodo de latencia variable. La Tabla XXIV demuestra que la viabilidad celular no decreció durante este periodo de latencia y las observaciones al microscopio óptico ordinario pusieron de manifiesto que durante dicho periodo estas células no exhibieron un incremento significativo de la esporulación.

Concentraciones variables de extracto de levadura en el medio de cultivo no tuvieron ningún efecto en el periodo de latencia observado antes de que este microorganismo empezase a crecer en la glucosa, ya que todos los cultivos presentaron un periodo de latencia igual, independientemente de la concentración extracelular de extracto de levadura del medio CM-4 (datos no mostrados). Mas aun, en un medio de cultivo mínimo definido (sin extracto de levadura) que permitía que este microorganismo se desarrollase en celobiosa, también tuvo lugar el crecimiento en glucosa pero después de un largo periodo de latencia (Figura 9).

También se investigó el efecto del pH inicial en el crecimiento de este microorganismo en D-glucosa. A pHs menores de 6.1, el microorganismo no creció ni en celobiosa ni en glucosa (Figura 10). Sin embargo, cuando el pH era mayor de 6.4-6.5, las células de C. thermocellum iniciaron el crecimiento en la glucosa pero de nuevo, después de un largo periodo de latencia (Figura 11).

Concentraciones distintas del carbohidrato en el medio extracelular no ejercieron efecto alguno en el periodo de latencia observado para que

este microorganismo empezase a crecer en la glucosa. Sin embargo, el tipo de azucar que el microorganismo utiliza si que determina la concentracion final de celulas y los rendimientos celulares aparentes obtenidos al final del crecimiento. La Tabla XXV resume los resultados de las figuras 12 y 13. Tales resultados indican que cuando

C. thermocellum, crece bajo condiciones en las que el carbohidrato es el factor limitante, alcanza mayores concentraciones finales y mejores rendimientos celulares al crecer en celobiosa que al hacerlo en glucosa a concentraciones de carbohidratos equivalentes.

Se puede hipotetizar que hay esencialmente dos razones por las que dependiendo del carbohidrato utilizado cambian las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes. Una, es que depende de la forma en que los azucares se transportan al interior de la celula y otra, que ello se debe a la clase y concentracion de los productos catabolicos finales obtenidos. La Tabla XXVI resume los resultados de las Figuras 14 y 15. Dado que los productos finales del catabolismo celular son los mismos y a las mismas concentraciones finales cuando el microorganismo crece en glucosa o celobiosa, pero sin embargo, son diferentes las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes, se puede afirmar que las diferencias arriba observadas son un reflejo de la manera en que C. thermocellum transporta la glucosa o la celobiosa al interior de las celulas. Parece como si se

necesitase mas energia para transportar la glucosa que la celobiosa. Esto significa que la glucosa es como sustrato energeticamente menos favorable que la celobiosa.

Los experimentos siguientes se hicieron para obtener alguna informacion sobre la utilizacion por este microorganismo de los azucares solubles presentes en el medio de cultivo y sobre cuales son los mecanismos de regulacion (si hay alguno) mediante los cuales este microorganismo controla su incorporacion, transporte y utilizacion.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos cuando las celulas de C. thermocellum ATCC-27405, no adaptadas a crecer en glucosa, se inocularon en un medio que contiene concentraciones equivalentes de celobiosa y de D-glucosa. La celobiosa fue el primer azucar en utilizarse. De hecho estas celulas no consumieron glucosa alguna en las primeras ocho horas de fermentacion. Despues de cuarenta horas de fermentacion, solo se consumieron 600 mg/ml de glucosa, pero la utilizacion de la glucosa ocurrio sin un incremento detectable de la masa celular. El hecho de que estas celulas no utilizan la glucosa en presencia de celobiosa, no debe considerarse como un fenomeno de represion catabolica de aquella por esta ya que el experimento control, en el que la glucosa era el unico carbohidrato disponible demostro que estas mismas celulas necesitaron de un periodo de latencia de 22 horas para empezar a crecer en la glucosa.

Por el contrario, cuando las células de C. thermocellum adaptadas a crecer en glucosa, se sembraron en una mezcla de glucosa y de celobiosa el azúcar que antes se utilizó fue la glucosa. Mas aun, la celobiosa no empezó a utilizarse hasta que desapareció del medio de cultivo toda la glucosa (Figura 17). La Figura 18 ilustra de nuevo la utilización preferencial de la glucosa sobre la celobiosa por los cultivos de C. thermocellum adaptados a crecer en glucosa. Estos resultados demuestran, que los cultivos adaptados a crecer en glucosa, aun creciendo en celobiosa, consumen preferentemente la glucosa al adicionar esta última al medio de cultivo.

Por ello se llevaron a cabo algunos experimentos mas para entender la naturaleza del mecanismo de regulación por el que la D-glucosa controla la utilización de celobiosa en las células de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa.

Los experimentos in vitro con células salvajes de este microorganismo (Tabla XXVIII) parecen indicar que en las adaptadas a crecer en glucosa la acción de esta hexosa en la utilización de la celobiosa debe de ser intracelular, bien inhibiendo el mecanismo de transporte de la celobiosa o bien su metabolismo. Ya que el mecanismo molecular del transporte de celobiosa no se conoce en este momento, solo es posible observar el efecto inhibitorio de la glucosa en la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa, la primera enzima involucrada en el metabolismo de la celobiosa y quizás tambien en su transporte.

La Tabla XVII muestra que las células de C. thermocellum adaptadas y sin adaptar a crecer en glucosa tienen para la actividad celobiosa fosforilasa prácticamente los mismos valores de actividad específica y Km. La síntesis de esta enzima es por lo tanto constitutiva y su síntesis no está sometida a represión por la presencia de glucosa.

Sin embargo, la glucosa sí que inhibió fuertemente la actividad celobiosa fosforilasa en experimentos con extractos libres de células (Tabla XIX). El análisis estadístico por regresión no-lineal de los datos experimentales obtenidos, reveló que el mecanismo de inhibición por la glucosa es de hecho competitivo y que cinéticamente posee una K_i de $0.41 \times 10^{-3} M$ (Figuras 20 y 21). Esto fuertemente sugiere que al menos uno de los mecanismos por los cuales la glucosa controla la utilización de la celobiosa por las células de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa, es por inhibición competitiva de la enzima celobiosa fosforilasa.

La actividad β -glucosidasa de este microorganismo también se sometió al mismo tipo de análisis que el de la enzima celobiosa fosforilasa. De la Tabla XXX se puede concluir que esta enzima también se produce constitutivamente. Su actividad también se inhibió en experimentos con extractos libre de células en los cuales había glucosa (Figuras 23, 24, 25 y 26). Sin embargo, la K_i de esta actividad por la D-glucosa es de

$23.78 \times 10^{-3} M$ lo cual indica que la inhibición de la enzima β -glucosidasa por la glucosa es mucho menor que la ejercida en la enzima celobiosa fosforilasa. Sin embargo, el significado de la presencia de esta enzima en *C. thermocellum* y su posible relación con el transporte y la utilización de la celobiosa y de la glucosa no se entienden todavía.

Finalmente, se llevaron a cabo dos experimentos más para determinar la estabilidad de la utilización preferencial de la glucosa sobre la celobiosa en los cultivos de este microorganismo adaptados a crecer en glucosa. Los cultivos "adaptados a glucosa" se crecieron al menos durante 100 generaciones en celobiosa y luego se inocularon en una mezcla de celobiosa y glucosa a la misma concentración final (Figura 27). La utilización de la celobiosa y de la glucosa fue simultánea, lo que sugiere que estas células han adquirido la capacidad de utilizar ambos azúcares simultáneamente, o más probablemente que en estos cultivos han evolucionado dos poblaciones de células. Una población utiliza preferencialmente la glucosa frente a la celobiosa y la otra solamente utiliza la celobiosa. La Figura 28 sugiere la misma explicación. Mas adelante se dará una explicación mas amplia de estos resultados.

C. Energización del Sistema Activo de Transporte de la D-Glucosa en *C. thermocellum* ATCC-27405

El estudio de los mecanismos específicos involucrados en el transporte y en la utilización de la glucosa por *C. thermocellum* ATCC-27405 se inició con dos objetivos en mente: primero, encontrar una explicación razonable al hecho de que las concentraciones finales de células y los rendimientos celulares aparentes son diferentes cuando el microorganismo crece en celobiosa o en glucosa y segundo, determinar el mecanismo específico del transporte de la glucosa para elucidar más tarde su regulación.

La incorporación de glucosa por las células de *C. thermocellum* se muestra en la Figura 29. Las células de *C. thermocellum* adaptadas a crecer en glucosa incorporaron glucosa pero las no adaptadas no lo hicieron. Este sistema de incorporación o transporte de glucosa tiene una V_{max} de 45 nanomoles de glucosa incorporada/min. x mg de peso celular seco y una K_m de $1.42 \times 10^{-3} M$ (Figura 31). Cuando estos valores cinéticos se comparan con los alcanzados con las células de este microorganismo creciendo en un medio complejo, se observa que la velocidad de incorporación de la glucosa es 5.5 veces mayor en el sistema in vitro que en el sistema in vitro, pero sin embargo, los valores de la K_m son prácticamente iguales en los dos sistemas (Figura 34) llegando a la conclusión de que el ensayo in vitro mide una fracción significativa del sistema de transporte activo y por lo tanto es lo suficientemente sensible como para llevar a cabo estudios más amplios con este sistema experimental.

De la Tabla XXXII se desprende, que aunque las células no adaptadas a crecer en glucosa poseen una enzima que es capaz de fosforilar la glucosa no pueden utilizar este azúcar si no hasta después de un período de latencia muy largo. Se puede concluir entonces, que la enzima glucoquinasa no es el factor limitante de la utilización de la glucosa por estos cultivos sino que debe de estar a nivel del sistema enzimático que media el transporte de la glucosa del exterior al interior de las células.

El análisis cinético de la velocidad inicial de incorporación de la glucosa dio una línea recta lo que sugiere la presencia de un sistema de transporte activo, saturable y único para este azúcar (Figura 31). En los experimentos siguientes se pretendió encontrar la conexión entre el compuesto químico donador de energía y el sistema enzimático de transporte activo

La inhibición de la incorporación de glucosa por el arsenato y el fluoruro se puede tomar como prueba presuntiva de que el transporte activo de la glucosa depende de la energía de hidrólisis de las moléculas que tienen grupos fosfato (Figuras 35 y 36 y Tabla XXXIV). A una concentración equivalente de desacoplador (DNP) que detuvo completamente el crecimiento de las células in vitro, no se inhibió en un 100% la incorporación de glucosa in vitro, lo que sugiere que la fuerza motriz PMF no es la fuente de energía para el transporte activo de la glucosa en este microorganismo (Figura 37 y Tabla XXXV).

Los datos de la Tabla XXXVIII complementan a todos los demas (Tablas XXXVI y XXXVII, Figura 38) en la diferenciacion de los sistemas de transporte activo permeasa-ATP y PEP-PTS. Como se puede observar, en las celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa la fosforilizacion de la glucosa solo tiene lugar cuando como donador de energia hay ATP en el medio extracelular. Esta claro que en estas mismas celulas el PEP (fosfoenolpiruvato) no puede fosforilizar la D-glucosa, eliminando asi la posibilidad de un sistema PEP-PTS de transporte de este azucar. Este resultado indica (por eliminacion de alternativas) que el transporte de glucosa en este microorganismo esta mediado por un sistema de transporte, permeasa-ATP.

Por lo tanto, la unica diferencia entre las celulas de C. thermocellum ATCC-27405 adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa parece ser la existencia de un transporte activo permeasa-ATP para la glucosa, el cual necesita de un periodo de latencia largo para expresarse pero cuya expresion ocurre en toda la poblacion de celulas no adaptadas. La presencia de este sistema especifico de transporte activo de glucosa explica el hecho de que en este microorganismo la utilizacion de glucosa sea energeticamente menos favorable que la utilizacion de celobiosa. Asumiendo que se gasta un mol de ATP en transportar un mol de celobiosa, la conversion de un mol de celobiosa en dos moles de glucosa-6-fosfato debe de requerir dos moles de ATP. Por otra parte ya que el transporte de un mol de glucosa requiere

un mol de ATP, se requeriran cuatro moles de ATP para la produccion de dos moles de glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa. Por lo tanto, este microorganismo gasta el doble de energia para transportar y fosforilizar la glucosa a partir de este mismo azucar que para transportar y fosforilizar la glucosa a partir de la celobiosa.

VII. CONCLUSIONES

1. De todas las cepas de C. thermocellum disponibles al comienzo de esta investigacion, la ATCC-27405, mostro el crecimiento mas rapido y prolifico en celobiosa (tiempo de duplicacion de 2.7 horas), la mejor produccion de etanol (0.48 g/l, a una velocidad de formacion de 0.12 g./g. celulas-hora) y la resistencia mas alta a la inhibicion del crecimiento por el etanol (10 g/l de etanol inhibieron el crecimiento en un 50%).
2. A partir de tres cepas diferentes de C. thermocellum se aislaron tres microorganismos anaerobios termofilos contaminantes que se denominaron HG1, HG2 y HG3. El microorganismo HG2 produce el doble de etanol que C. thermocellum ATCC-27405 a una velocidad de formacion especifica mayor y es mas resistente a la inhibicion del crecimiento por el etanol. Este microorganismo crece en xilano, D-xilosa, D-glucosa y celobiosa pero no en celulosa Solka Floc.
3. C. thermocellum ATCC-27405 produce enzimas extracelulares con actividades celuloliticas y hemiceluloliticas. Estas actividades se caracterizaron y cuantificaron usando como sustratos papel de filtro, carboximetilcelulosa y xilano. Es interesante el hecho de que este microorganismo aunque no crece en los productos de la hidrolisis del xilano, tiene una fuerte actividad xilanasa.

Estas enzimas extracelulares con actividades FPasa, CMCasa y xilanasa se produjeron constitutivamente y su síntesis no estuvo sometida a represión por celobiosa ni por glucosa.

4. El microorganismo HG2 es también capaz de producir enzimas extracelulares con actividades hidrolíticas. Es interesante el hecho de que este microorganismo aunque es incapaz de crecer en la celulosa posee proteínas extracelulares con actividades CMCasa y Xilanasa. Estas enzimas son inducibles cuando el microorganismo crece en xilano pero su síntesis es fuertemente inhibida cuando el microorganismo crece en celobiosa, D-glucosa o D-xilosa.
5. C. thermocellum ATCC-27405 crece en celulosa, celobiosa, D-glucosa y D-fructosa. Sin embargo, ninguna de las pentosas ni otras muchas hexosas analizadas fueron capaces de sustentar el crecimiento de este microorganismo.
6. C. thermocellum ATCC-27405 crece en D-glucosa como la única fuente de carbono y energía pero antes de que este crecimiento tenga lugar se observa un largo periodo de latencia. Una vez que este microorganismo crece en glucosa por primera vez mediante cultivos sucesivos en dicha hexosa se obtienen células adaptadas a crecer en glucosa. Estas células no necesitan de un periodo

de latencia largo para crecer en este azucar, pero sin embargo, las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes son menores cuando crecen en glucosa que cuando lo hacen en celobiosa a concentraciones equivalentes de azucar. La capacidad de crecer en glucosa es una caracteristica de la poblacion total de celulas y no se debe a la presencia en estos cultivos de unas pocas celulas mutantes que gozen de esta capacidad.

7. Cuando C. thermocellum ATCC-27405 crece en una mezcla de celobiosa y glucosa utiliza estos azucares secuencialmente. La celobiosa es el primer azucar en consumirse y la utilizacion posterior de la glucosa esta limitada por el pH final del medio de cultivo y por el periodo de latencia requerido para la expresion de su sistema especifico de transporte. Bajo estas condiciones, la glucosa no afecta ni al transporte ni a la utilizacion de la celobiosa.
8. Cuando las celulas de C. thermocellum ATCC-27405 adaptadas a crecer en glucosa crecen en una mezcla de celobiosa y glucosa se utiliza preferencialmente la glucosa y de hecho la celobiosa no empieza a utilizarse hasta que toda la glucosa desaparece del medio de cultivo. Esto se debe a la acumulacion intracelular de la glucosa que ejerce una inhibicion competitiva en la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa.

9. El transporte de glucosa en C. thermocellum ATCC-27405 se realiza via la generacion de un sistema especifico de transporte permeasa-ATP. La unica diferencia detectable entre las celulas de este microorganismo adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa es la existencia de este sistema, el cual requiere para expresarse un largo periodo de latencia pero cuya expresion ocurre en toda la poblacion de celulas adaptadas.
10. El hecho de que la glucosa se transporte en este microorganismo via este sistema hace que la glucosa como sustrato sea energeticamente menos favorable que la celobiosa. Esto explica el que las concentraciones finales de celulas y los rendimientos celulares aparentes sean menores cuando el microorganismo crece en glucosa que cuando lo hace en celobiosa a concentraciones equivalentes de azucar.
11. La celobiosa, la glucosa y posiblemente algunos oligosacaridos de cadena corta son los unicos azucares solubles utilizados por este microorganismo cuando crece en sustratos organicamente complejos como la celulosa Solka Floc. Ya que las consideraciones energeticas previamente desarrolladas permiten comprender el porque de la utilizacion secuencial de glucosa y celobiosa, en el apendice final y basandonos en los datos experimentales

obtenidos a lo largo de este trabajo vamos a proponer algunos modelos teoricos de regulacion a nivel genetico que podrian estar involucrados en la utilizacion secuencial de la glucosa y de la celobiosa por las celulas de este microorganismo tanto adaptadas como no adaptadas a crecer en glucosa.

VIII. PROBLEMAS A RESOLVER

1. El rendimiento en etanol durante la fermentacion de la celulosa parece estar limitado por la produccion de otros productos catabolicos finales y por las propiedades inhibidoras del etanol a altas concentraciones en el medio de cultivo. La seleccion de mutantes lactato deshidrogenasa⁻ y acido acetico⁻, el estudio de los componentes del medio de cultivo que pueden afectar la actividad de la enzima piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa y la seleccion de estirpes mas resistentes a la inhibicion por el etanol van a ser de gran importancia para incrementar mucho mas la concentracion final de etanol producida por C. thermocellum.
2. Los rendimientos en etanol estan tambien limitados por el hecho de que C. thermocellum ATCC-27405 acumula pero no utiliza la mayor parte de los azucares solubles producidos durante la fermentacion de la celulosa. Ya que el microorganismo HG2 fermenta y produce etanol a partir de todos los azucares solubles producidos por la hidrolisis enzimatica de los sustratos celulosicos complejos los cultivos mixtos de C. thermocellum/microorganismo HG2 pueden ser una buena alternativa para incrementar estos rendimientos en etanol. Esta aproximacion ya ha demostrado su efectividad por experimentos llevados a cabo por otro grupo de investigadores en este laboratorio.

3. Cuando las proteínas extracelulares producidas por este microorganismo se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, ninguna acción se tomó para investigar las capacidades celulolíticas de cada una de las bandas obtenidas. Mas trabajo se debe llevar a cabo en el aislamiento y la caracterización de los componentes proteicos envueltos en cada una de las actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. La inyección en vectores genéticos ("cloning") de los genes que codifican por estos componentes proteicos, pueden usarse para transformar otros microorganismos capaces de producir concentraciones de etanol mas altas pero los cuales no pueden hidrolizar enzimáticamente los sustratos celulosicos complejos.
4. Debe hacerse un esfuerzo mayor dirigido a la elucidación del mecanismo enzimático de transporte de celobiosa en C. thermocellum ATCC-27405. Se ha sugerido la presencia de una permeasa específica de transporte pero su presencia no se ha demostrado. Alternativamente, la enzima celobiosa fosforilasa podría estar no solamente implicada en la hidrólisis y fosforilación, sino también en el transporte de celobiosa a través de la membrana celular. Si esta última hipótesis se confirmase se podría intentar el "cloning" de esta actividad para construir por ingeniería genética especies microbianas

capaces de transportar y utilizar con eficacia la celobiosa. Dos especies microbianas productoras de etanol podrian ser interesantes como receptoras de esta actividad: la levadura Sacharomyces cerevisae y la bacteria Zymomonas mobilis.

5. Hemos propuesto algunos modelos especificos de regulacion, posiblemente involucrados en el transporte y utilizacion de glucosa por celulas de C.thermo-cellum ATCC-27405. Todos estan basados en la generacion de reordenamientos geneticos especificamente y unicamente envueltos en el transporte y utilizacion de glucosa por este microorganismo. En estos momentos en que una parte de la comunidad cientifica esta tratando de entender el efecto de los reordenamientos geneticos en los mecanismos de mutacion, regulaciones metabolicas y cancer, podria ser importante el poder demostrar sin lugar a dudas que los reordenamientos geneticos controlan el transporte y utilizacion de la glucosa en este microorganismo. La presencia de reordenamientos geneticos se puede demostrar con ayuda de una tecnica experimental desarrollada por Southern en 1975. Lo que se pretende es poder demostrar que el ADN completo de las celulas de este microorganismo adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa puede tener un esquema de restriccion distinto como consecuencia de estos reordenamientos geneticos.

APENDICE I

MODELOS MOLECULARES DE REGULACION GENETICA POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS EN EL
TRANSPORTE Y UTILIZACION DE GLUCOSA POR C.THERMOCELLUM ATCC-27405

Gracias a sus actividades extracelulares celulolíticas y hemicelulolíticas, C. thermocellum ATCC-27405 es capaz de degradar los sustratos celulosicos complejos a productos finales sencillos como celodextrinas, xilobiosa, D-xilosa, celobiosa y D-glucosa. Sin embargo, solo la celobiosa, la glucosa y posiblemente algunas celodextrinas de cadena corta se van a utilizar como fuentes de carbono y energia.

Nosotros hemos observado experimentalmente que en las celulas salvajes de C. Thermocellum ATCC-27405, la celobiosa se utiliza como sustrato preferencialmente a la glucosa (Figura 16) y de hecho esta hexosa no se utiliza a menos que de alguna forma se ejerza una presion directa para su consumo (Figura 7). La glucosa por si misma no parece ejercer ninguna accion reguladora en el transporte y utilizacion de la celobiosa (Figura 16 y Tabla XXVII).

Sin embargo, una vez que las celulas de este microorganismo se adaptan a crecer en glucosa, este azucar se utiliza como sustrato con preferencia a la celobiosa (Figuras 17 y 18). Al menos una de las razones por las que esto ocurre es por la acumulacion intracelular de la glucosa (Figura 29) que ejerce una inhibicion de tipo competitivo en la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa (Figura 21). Esto puede deberse a que la glucosa es uno de los productos finales de la actividad celobiosa fosforilasa.

Finalmente, la unica diferencia entre las celulas de C.thermocellum ATCC-27405 adaptadas y no adaptadas a crecer en glucosa parece ser la presencia de un sistema de transporte permeasa-ATP, especifico para la glucosa (Tabla XXVIII) el cual necesita para expresarse de un periodo de latencia largo pero cuya expresion ocurre en la poblacion total de celulas no adaptadas a crecer en glucosa (Tabla XXIII).

Para racionalizar cualquier mecanismo de regulacion del sistema de utilizacion de glucosa, este azucar como tal debe de eliminarse como molecula inductora ("inducer") ya que siempre hay glucosa dentro de las celulas a consecuencia de la actividad de la enzima celobiosa fosforilasa. Tampoco se puede considerar como la molecula inductora ningun producto del metabolismo de la glucosa porque el metabolismo de la glucosa como el de la celobiosa siguen la misma ruta metabolica.

Nosotros imaginamos el mecanismo de incorporacion de la glucosa como uno de supervivencia para las celulas con implicaciones a nivel genetico. Como sustrato la glucosa es menos favorable energeticamente que la celobiosa. Por lo tanto, es mas ventajoso para las celulas utilizar la celobiosa que la glucosa. El gen (es) de la utilizacion de la glucosa puede permanecer en un estado criptico pero cuando se ejerce una presion selectiva sobre el microorganismo para crecer en glucosa como unica fuente de carbono y energia podria catalizarse la formacion de una proteina reguladora via un mecanismo desconocido y el gen(es) Gut podria

ser transcrito. Esta proteina reguladora podria catalizar la reaccion representada en la Figura 39. En este modelo de regulacion habria que asumir en principio que los cambios en la expresion genetica del gen(es) Gut estan controlados por la orientacion de una region del ADN que contiene el promotor ("promoter") del gen(es) Gut. La inversion de esta region se realizaria por recombinacion en lugares especificos (X) y estaria catalizada por el producto de un gene (hin) que reside en esta region invertible. La letra X corresponde a la localizacion de las secuencias de nucleotidos complementarias, hin es el gen que codifica la proteina que cataliza la inversion de este elemento genetico y Gut es el gen (es) que codifica el sistema de incorporacion, transporte o utilizacion de la glucosa.

Como mecanismo de regulacion posible debemos analizar tambien el modelo operador-represor porque es el mas generalizado en los procariotes. Este modelo postula la presencia de moleculas de represor que producidas constitutivamente pueden ser especificas del operador del gen (es) Gut y uniendose a este impediran la transcripcion del gen(es) proximos. La existencia de una zona de recombinacion activa ("hot spot") en el represor podria crear mutaciones via la insercion de secuencias de insercion o de transposones, las cuales cambiarian la estructura del represor tan drasticamente que la molecula de represor no se produciria o no se podria unir al operador. Bajo estas condiciones seria posible la transcripcion del gen(es) Gut. La misma celula mediante un mecanismo

111

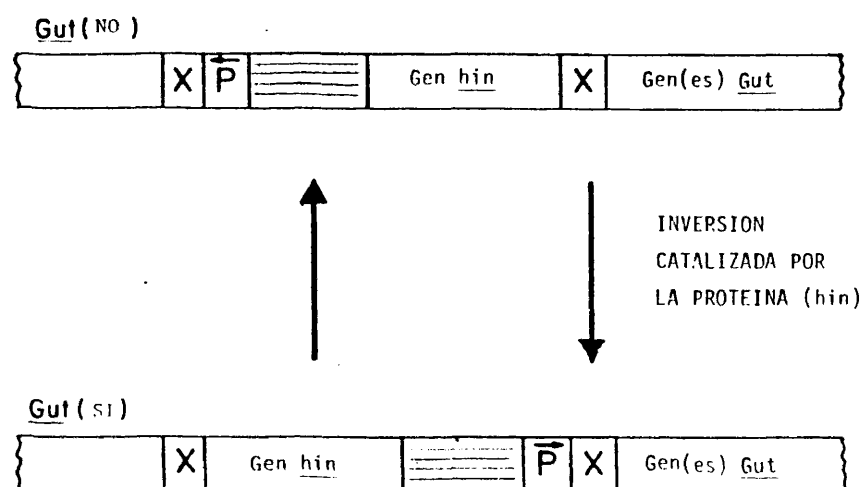


Figura 39: Modelo de Inversion por Recombinacion Especifica
de la Region que Controla la Actividad Gut

desconocido podria activar la transposicion de estos elementos desde su localizacion en el genoma hasta estas zonas de recombinacion activa.

Finalmente como tercer modelo de regulacion posible, se puede predecir la existencia de una estructura terciaria relativamente compleja y estable en el operador del gen(es) Gut, lo que impediria la union de las moleculas de RNA-polimerasa a este promotor y por lo tanto la transcripcion de estos genes. Esta estructura terciaria podria desaparecer fisicamente por transposicion a este lugar de una secuencia de insercion o de un transposon en una reaccion catalizada por un mecanismo desconocido. Alternativamente, es posible que el sitio de recombinacion por si mismo coloque el promotor de este elemento translocable en una direccion favorable para la transcripcion del gen(es) Gut.

Estos modelos de regulacion propuestos tienen dos factores en comun: estan basados en la existencia de reordenamientos geneticos y son reversibles. El demostrar experimentalmente la existencia de reordenamientos geneticos en la region del ADN que controla la actividad del gen(es) Gut no es posible en estos momentos a no ser que por tecnicas de ingenieria genetica aislemos esta region y la analizemos geneticamente. Pero la reversibilidad de esta regulacion si que se ha observado experimentalmente. En las celulas de este microorganismo adaptadas a crecer en glucosa, la celobiosa no se utiliza hasta que se ha eliminado toda la glucosa del medio extracelular (Figura 17). Sin embargo los datos de la Figura 27 sugieren que despues de multiples crecimientos de las celulas adaptadas

a glucosa en un medio que solo contiene celobiosa, existe (surge) una poblacion mixta de microorganismos que utilizan independientemente celobiosa o glucosa.

Es decir, cuando en las celulas adaptadas a glucosa eliminamos la presion para crecer en este azucar como la unica fuente de carbono y energia, de nuevo este microorganismo parece organizar su poblacion a utilizar la celobiosa preferencialmente sobre la glucosa.

APENDICE II

LOS ELEMENTOS GENETICOS TRANSLOCABLES COMO REGULADORES DE LA EXPRESION GENETICA

Los elementos geneticos translocables son tiras o trocitos de ADN, que como entidades discretas fisicas y geneticas (funcionales), pueden moverse de una posicion a otra en el mismo o diferente genoma. La translocacion de estos elementos esta promovida por sistemas de recombinacion distintos de los que tienen lugar durante la recombinacion por homologia, ya que estas transposiciones ocurren tambien en bacterias en las que la recombinacion por homologia se ha eliminado por mutacion en el gen recA (Kleckner, 1977).

Los elementos translocables que hasta ahora han cumplido estos criterios se han agrupado por conveniencia en tres categorias basandose en su complejidad genetica: 1. IS, o secuencias de insercion, que pueden tener un tamaño tan pequeño como 800 pares de bases, 2. "transposons", que codifican por resistencia frente a antibioticos y contienen de 2,000 a 3,000 pares de bases y 3. los bacteriofagos que tambien se pueden considerar como elementos geneticos translocables pero mucho mas grandes. Dos elementos geneticos mas, la secuencia 5r del episoma F (Ohtsubo et.al, 1974; Hu, Ohtsubo y Davidson, 1975) y la secuencia G del fago Mu (Bukhari, 1976) promueven tambien estados de recombinacion "ilegitima", pero todavia no se ha demostrado claramente que se puedan mover en el genoma como entidades fisicas separadas de la secuencia genetical total en la que estan integrados.

Mediante estudios realizados con el microscopio electronico se ha demostrado, que las secuencias de insercion se insertan en el ADN como segmentos lineales bien definidos. Hasta ahora, se han identificado cuatro clases distintas de secuencias de insercion, que no muestran homologia en sus secuencias, y que se han denominado IS1, IS2, IS3 y IS4 atendiendo a su tamaño. Los elementos geneticos translocables con resistencia frente a antibioticos ("transposons") no solo son capaces de translocarse, sino que tambien codifican por resistencia frente a uno o mas antibioticos. Los elementos hasta ahora identificados se han denominado Tn y ya se han numerado de Tn1 a Tn10. Los estudios al microscopio electronico han revelado que la mayor parte de estos elementos tienen como característica excepcional el que en cada uno de los extremos de su estructura hay unas secuencias cortas de pares de bases las cuales manifiestan homologia entre si. Estas secuencias homologas pueden estar orientadas en la misma direccion, constituyendo una repeticion directa o pueden estarlo en direccion opuesta constituyendo asi una repeticion inversa. Los virus bacterianos lambda y Mu tambien introducen sus genomas linealmente en el cromosoma bacteriano durante la lisogenizacion. Esta insercion tambien es independiente de la funcionalidad del gene recA.

Es interesante que ademas de moverse de un lado a otro en el genoma, estos elementos translocables tambien pueden mediar otros reordenamientos geneticos

como deleciones, inversiones, inserciones y duplicaciones. Al insertarse en cualquier lugar en el genoma, estos elementos pueden afectar directamente la expresion de los genes vecinos. La insercion de estos elementos en un gen determinado resulta normalmente en la inactivacion de este gen y de los genes distales de la misma unidad de transcripcion (Shapiro, 1969; Botstein and Kleckner, 1977; Kleckner et al., 1979; Ross et al., 1979; Syvanen, 1980). Sin embargo, en el caso de los tres elementos transposables IS2, Tn3 y Tn5, su insercion, puede conducir a veces a la activacion de un gen o de un operon proximo a su insercion por la presencia de promotores dentro de estos elementos. La transcripcion a partir de estos promotores solo requiere una orientacion adecuada del elemento translocable en relacion con el gen o genes proximos (Saedler et al., 1974; Hefron et al., 1975; Berg et al., 1980).

Mas aun, algunos de los reordenamientos geneticos mediados por estos elementos parecen formar parte de sistemas de control biologico muy especificos. Asi por ejemplo, la activacion de la expresion genetica de un gen en estado criptico puede ocurrir por inversion, como en los casos del cambio de la estructura antigenica de la capsula celular de Salmonella (Zieg et al., 1977; Zieg, Hilmen y Simon, 1978; Silverman y Simon, 1980) o en la seleccion del hospedador adecuado por la secuencia G del bacteriofago Mu (Howe, 1980); o puede ocurrir por insercion como en el control de la expresion del gen int del

bacteriofago P2 (Bertani, 1970) o en la activacion del operon bgl en E.coli K-12 (Reynolds, comun. personal). Este mecanismo puede estar tambien involucrado en la activiacion del gen que codifica la enzima B-glucosidasa una enzima esencial para el catabolismo de la celobiosa en Salmonella (Schaeffler y Malamy, 1979) y puede ser en realidad un mecanismo de control muy extendido.

Finalmente hay que decir, que aunque es muy dificil establecer la frontera entre los mecanismos biologicos de control especificos y no especificos mediados por estos elementos, no hay ninguna duda de que los reordenamientos geneticos mediados por estos elementos translocables si que pueden contribuir significativamente en la capacidad de un organismo de reorganizar su genoma en respuesta a diferentes presiones selectivas (Kleckner y Gross, 1980).

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, J.K. 1961. Characteristics of cellobiose phosphorylase. *J. Bacteriol.* 81:903-910.
- Alexander, J.K. 1968. Purification and specificity of cellobiose phosphorylase from C. thermocellum. *J. Biol. Chem.* 243:2899-2904.
- Alexander, J.K. 1968. Synthesis of 4-0- β -Glucopyranosyl D-xylose, 4-0- β -Glucopyranosyl D-arabinose, 4-0- β -Glucopyranosyl 2-deoxy-glucose, 4-0- β -Glucopyranosyl D-mannose and 4-0- β -Glucopyranosyl D-glucosamine by cellobiose phosphorylase from C. thermocellum. *Arch. Biochem. Biophys.* 123:240-246.
- Alexander, J.K. 1972. Cellobiose phosphorylase from C. thermocellum. *Methods in Enzymology.* 28:944-948.
- Alexander, J.K. 1972. Cellodextrin phosphorylase from C. thermocellum. *Methods in Enzymology.* 28:948-953.
- Ait, N., N. Creuzet y P. Forget. 1979. Partial purification of cellulase from C. thermocellum. *J. Gen. Microbiol.* 113:399-402.
- Ait, N., N. Creuzet y J. Cattaneo. 1979. Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from C. thermocellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90:537-546.
- Ashgar, S.S., E. Levin y F.M. Harold. 1973. Accumulation of neutral amino acids by S. faecalis. *J. Biol. Chem.* 248: 5225-5233.
- Berg, D.E., A. Weiss y L. Crossland. 1980. Polarity of Tn5 insertion in E. coli. *J. Bacteriol.* 142:439-446.
- Berghem, L.R.E. y L.G. Petterson. 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from T. viridae active on highly ordered cellulose. *Europ. J. Biochem.* 37:21-30.
- Bertani, L.E. 1970. Split-operon control of a prophage gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65:331-336.
- Boonstra, J., M.T. Huttunen, W.N. Konings y H.R. Kaback. 1975. Anaerobic transport in E. coli membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 250:6792-6798.

- Boonstra, J., H.J. Ships y W.N. Konings. 1976. Active transport by membrane vesicles from anaerobically grown E. coli energized by electron transfer to ferricyanide and chlorate. Europ. J. Biochem. 69:35-44.
- Boonstra, J. y W.N. Konings. 1977. Generation of an electrochemical proton gradient by nitrate respiration in membrane vesicles from anaerobically grown E. coli. Europ. J. Biochem. 78:361-368.
- Boonstra, J., J.A. Downie y W.N. Konings. 1978. Energy supply for active transport in anaerobically grown E. coli. J. Bacteriol. 136:844-853.
- Boos, W. 1974. Bacterial transport. Ann. Rev. Biochem. 43:123-146.
- Booth, I.R. y J.G. Morris. 1975. Proton motive force in the obligately anaerobic bacterium C. pasteurianum: a role in galactose and gluconate uptake. FEBS Letters 59:153-157.
- Botstein, D. y N. Kleckner. 1977. In DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. (Bukhari, Shapiro and Adhya, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Buchanan, R.E. y N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. pp. 572. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bukhari, A.I. 1972. Bacteriophage Mu as a transposition element. Ann. Rev. Genet. 10:389-412.
- Bullock, J.D. 1979. Industrial alcohol. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 29:307-325.
- Carlsson, J. 1973. Simplified gas chromatographic procedure for identification of bacterial metabolic products. Appl. Microbiol. 25:287-289.
- Clarke, D.J. y J.G. Morris. 1976. Partial purification of a dicyclohexylcarbodiimide-sensitive membrane adenosine triphosphatase complex from the obligately anaerobic bacterium C. pasteurianum. Biochem. J. 154:725-729.

- Conrad, R. y H.G. Schlegel. 1977. Different degradation pathways for glucose and fructose in Rhodopseudomonas capsulata. Arch. Microbiol. 112:39-48.
- Daniels, L. y J.G. Zeikus. 1975. Improved culture flask for obligate anaerobes. Appl. Microbiol. 29:710-711.
- Deshpande, V., K.E. Erikson y B. Petterson. 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from Sporotrichum pulverulentum. Eur. J. Biochem. 90:191-198.
- Dills, S.S., A.A. Aperson, M.R. Schmidt y M.H. Saier, Jr. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. Microb. Rev. 44:385-418.
- Dunning, J.W. y E.C. Lathrop. 1945. The saccharification of agricultural residues. Ind. Eng. Chem. 37:24.
- Ferenci, T., W. Boos, M. Schwartz y S. Szmelman. 1977. Energy-coupling of the transport system of E. coli dependent on maltose-binding protein. Eur. J. Biochem. 75:187-193.
- Flickinger, M.C. y G.T. Tsao. 1978. Fermentation substrates from cellulose materials. Fermentation products from cellulose materials. Annual Report on Fermentation Processes. Vol. 2. D. Perlman (ed.). Academic Press, Inc., New York.
- Galeotti, T., L. Kavock y B. Hess. 1968. Interference of uncoupling agents with cellular energy-requiring processes in anaerobic conditions. Nature 218:194-196-
- Gomez, R.F. 1980. Prospect of conversion of cellulosic biomass to ethanol by thermophilic Clostridia. In Proc. Colloque Cellulolyse Microbienne. (J.P. Belbaich, ed.), Marseille.
- Grindley, J. 1977. In DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. (Bukhari, Shapiro and Adhya, eds.). pp. 116-123; pp. 595-596. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Hamilton, W.A. 1975. Energy coupling in microbial transport. Adv. Microb. Physiol. 12:1-53.
- Harold, F.M. 1970. Antimicrobial agents and membrane function. Adv. Microb. Physiol. 4:45-104.

- Harold, F.M. 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.* 36:172-230.
- Harold, F.M. 1977. Membranes and energy transduction in bacteria. *Curr. Top. Bioenerg.* 6:83-149.
- Harold, F.M. y J.R. Baarda. 1968. Inhibition of membrane transport in *S. faecalis* by uncouplers of oxidative phosphorylation and its relationship to proton conduction. *J. Bacteriol.* 96:2025-2034.
- Harold, F.M., E. Pavlosova y J.R. Baarda. 1970. A transmembrane pH gradient in *S. faecalis*: origin and dissipation by proton conductors and N-N'-dicyclohexylcarbodiimide. *Biochim. Biophys. Acta.* 196:235-244.
- Harold, F.M. y D. Papineau. 1972. Cation transport and electrogenesis by *S. faecalis*. I. The membrane potential. *J. Membrane Biol.* 8:27-44.
- Hefron, F., C. Rubens y S. Falkow. 1975. Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: molecular nature and specificity of insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3623-3627.
- Hodson, R.E. y F. Azam. 1979. Occurrence and characterization of a phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system in a marine bacterium, *Serratia marino*rubra. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:1086-1091.
- Hollaus, F. y U. Sleytr. 1972. On the taxonomy on some hyperthermophilic saccharolytic Clostridia. *Arch. Microbiol.* 86:129-146.
- Howe, M.M. 1980. The invertible G segment of phase Mu. *Cell* 21:605-606.
- Hsu, E.J. y Z.J. Ordal. 1970. Comparative metabolism and sporulating cultures of *C. thermosaccharolyticum*. *J. Bacteriol.* 102:369-376.
- Hugo, H. y G. Gottschalk. 1974. Distribution of 1-Phosphofructokinase and PEP: fructose phosphotransferase activity in Clostridia. *FEBS Letters* 46:106-108.
- Hungate, R.E. 1944. Studies on cellulose fermentation. I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. *J. Bacteriol.* 48:497-513.

- Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology* 38:117-132. Academic Press, Inc., New York.
- Jungerman, K., R.K. Thauer, G. Limenstroll y K. Decker. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxireductases in saccharolytic Clostridia. *Biochim. Biophys. Acta* 305:268-280.
- Kaback, H.R. 1972. Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 265:367-416.
- Keenan, J.D. 1979. Review of biomass to fuels. *Process Biochem.* 5:5-15.
- Kleckner, N. 1977. Translocatable elements in prokaryotes. *Cell* 11:11-23.
- Kleckner, N., J. Roth y D. Botstein. 1977. Genetic engineering "in vivo" using translocatable drug-resistance elements. *J. Mol. Biol.* 116:125-159.
- Kleckner, N. y D. Gross. 1980. rec A-dependent genetic switch generated by transposon Tn 10. *J. Mol. Biol.* 144:215-221.
- Konings, W.N. 1977. Active transport of solutes in bacterial membrane vesicles. *Adv. Microb. Physiol.* 15:175-251.
- Konings, W.M. y J. Boonstra. 1977. Anaerobic electron transfer and active transport in bacteria. *Curr. Top. Memb. Transp.* 9:177-231.
- Kundig, W., S. Gosh y S. Roseman. 1964. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52:1067-1074.
- Kundig, W., F.D. Kundig, B. Anderson y S. Roseman. 1966. Restoration of active transport of glycosides in *E. coli* by a component of a phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 241:3243-3246.
- Kundig, W. y S. Roseman. 1971. Sugar transport. I. Isolation of a phosphotransferase system from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 246:1393-1406.
- Kundig, W. y S. Roseman. 1971. Sugar transport. II. Characterization of constitutive membrane-bound enzymes II of *E. coli* phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 246:1407-1418.

- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Lamed, R. y J.G. Zeikus. 1980. Glucose fermentation pathway of Thermoanaerobium brockii. *J. Bacteriol.* 141: 1251-1257.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maloney, P.C. y T. Hastings Wilson. 1975. ATP synthesis driven by a proton motive force in Streptococcus lactis. *J. Memb. Biol.* 25:285-311.
- Mandels, M. y D. Sternberg. 1976. Recent advances in cellulose technology. *J. Ferment. Technol.* 54:267-286.
- Mandels, M. y R.E. Andreotti. 1978. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochem.* 13:6-13.
- McBee, R.H. 1948. The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. *J. Bacteriol.* 50: 653-663.
- McBee, R.H. 1950. The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:51-63.
- Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 41:445-452.
- Mitchell, P. 1967. Translocations through natural membranes. *Adv. Enzymol.* 29:33-87.
- Mitchell, P. 1973. Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems. *Bioenergetics.* 4:63-91.
- Mitchell, P. 1976. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* 62:327-367.
- Ng, T.K. y J.G. Zeikus. 1976. Anaerobic degradation of cellulose by anaerobic bacteria. *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 123, pp. 157.
- Ng, T.K., P.J. Weimer y J.G. Zeikus. 1977. Cellulolytic and physiological properties of C. thermocellum. *Arch. Microbiol.* 114:1-7.

- Ohtsubo, E., R.C. Deomer, H.J. Lee y N. Davidson. 1974. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of E. coli. IV. The F sequences in F14. J. Mol. Biol. 89:565-584.
- Padan, E., D. Zilberstein y H. Pottenberg. 1976. The proton electrochemical gradient in E. coli cells. Europ. J. Biochem. 63:523-541.
- Pape, M. 1976. The competition between microbial and chemical processes for the manufacture of basic chemicals and intermediates. pp. 515-531. In H.G. Schlegel and J. Barnea (eds.). Microbial Energy Conversion. E. Goltze, Göttingen.
- Patni, N.J. y J.K. Alexander. 1971. Utilization of glucose by C. thermocellum. Presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts. J. Bacteriol. 105: 220-225.
- Peterkofsky, A. y C. Gazdar. 1975. Interaction of the enzyme I of the phosphoenol pyruvate: sugar phosphotransferase system with adenylate cyclase of E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:2920-2924.
- Prevot, A.R. 1966. Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria. 1st American ed., pp. 306-307. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Ramos, S. y H.R. Kaback. 1977. The relationship between the electrochemical proton gradient and active transport in E. coli membrane vesicles. Biochemistry 16:854-859.
- Ramos, S. y H.R. Kaback. 1977. The electrochemical proton gradient in E. coli membrane vesicles. Biochemistry 16: 848-853.
- Ramos, S. y H.R. Kaback. 1977. pH-dependent changes in proton-substrate stoichiometries during active transport in E. coli membrane vesicles. Biochemistry 16:4271-4275.
- Reese, E.T. 1956- A microbiological progress report. Enzymatic hydrolysis of cellulose. Appl. Microbiol. 4:39-45.
- Rhoads, D.B. y W. Epstein. 1977. Energy coupling to net K^+ transport in E. coli K-12. J. Biol. Chem. 252:1394-1401.
- Reynolds, A.E., J. Felton y A. Wright. 1980. Activation of the cryptic bgl operon in E. coli K-12 is due to insertion of DNA. In press.

- Riebeling, V., R.K. Thauer y K. Jungerman. 1975. The internal-alkaline pH gradient sensitive to uncoupler and ATPase inhibitor in growing C. pasteurianum. Eur. J. Biochem. 55:445-452.
- Riebeling, V. y K. Jungerman. 1976. Properties and function of clostridial membrane ATPase. Biochim. Biophys. Acta 430:434-445.
- Romano, A.H., J.D. Trifone y M. Brustolon. 1979. Distribution of the phosphoenolpyruvate: phosphotransferase system in fermentative bacteria. J. Bacteriol. 139: 93-97.
- Roseman, S. 1969. The transport of carbohydrates by a bacterial phosphotransferase system. J. Gen. Physiol. 54: 138s-184s.
- Ross, D.G., J. Swan y N. Kleckner. 1979. Physical structures of Tn10-promoted deletions and inversions: role of 1400 bp inverted repetitions. Cell 16:721.
- Ryu, D.D.Y. y M. Mandels. 1980. Cellulases: biosynthesis and application. Enz. Microb. Technol. 2:41-102.
- Saedler, H., H.J. Reif, S. Hu y N. Davidson. 1974. IS2, a genetic element for turn-off and turn-on of gene activity in E. coli. Mol. Gen. Genet. 132:265-289.
- Saier, M.H. 1977. Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, functional and evolutionary relationships. Bact. Rev. 41:856-871.
- Schaeffler, S. y A. Malamy. 1969. Taxonomic investigations on expressed and cryptic phospho- β -glucosidases in enterobacteria. J. Bacteriol. 99:422-433.
- Segel, I.W. 1976. Biochemical Calculations, 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Shapiro, J.A. 1969. Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of E. coli. J. Mol. Biol. 40:93-105.
- Sih, C.J., N.M. Nelson y R.H. McBee. 1957. Biological synthesis of cellobiose. Science 126:1116-1117.
- Silverman, M. y M. Simon. 1980. Phase variation: genetic analysis of switching mutants. Cell 19:845-854.

- Simoni, R.D., M. Levinthal, F.D. Kundig, W. Kundig, B. Anderson, P.E. Hartman y S. Roseman. 1967. Genetic evidence for the role of a bacterial phosphotransferase system in sugar transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58:1963-1970.
- Slee, A.M. y J.M. Tanzer. 1979. Phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase activity in Streptococcus mutans NCTC 10449. *Inf. Immun.* 24:821-828.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Syvanen, M. 1980. Tn 903 induces inverted deletions in the chromosome of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 139:1.
- Thauer, R.K., K. Jungerman y K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact. Rev.* 41:100-180.
- Tsao, G.T., M. Ladish, T.A. Hsu, B. Gale y T. Chou. 1978. Fermentation substrates from cellulosic materials: production of fermentable sugars from cellulosic materials, pp. 1-23. In D. Perlman (ed.). *Annual Reports of Fermentation Processes*, Vol. 2, Academic Press, Inc., New York.
- Uyeda, K. y J.C. Rabinowitz. 1971. Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. III. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 246:3111-3119.
- Vidine, J.G. y L.Y. Quinn. 1969. *Bacteriol. Proc.*, p. 135.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, R.F. Gomez y A.J. Sinskey. 1976-1980. Degradation of cellulosic biomass and its subsequent utilization for the production of chemical feedstocks. Progress reports submitted to the U.S. Department of Energy under Contract No. EG-77-S-02-4198.
- Wang, S. 1979. Production of ethanol from cellulose by C. thermocellum. SM Thesis, Department of Nutrition and Food Science, M.I.T., Cambridge, MA 02139.
- Wagner, E.F., J.D. Fabricant y M. Schweiger. 1979. A novel ATP-driven glucose transport system in E. coli. *Eur. J. Biochem.* 102:231-236.
- Wagner, E.F., H. Ponta y M. Schweiger. 1980. Development of E. coli virus T1. The role of the proton motive force. *J. Biol. Chem.* 255:534-539.

- Weimer, P.J. y J.G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by C. thermocellum in the absence and presence of Methanobacterium thermoautotrophicum. Appl. Environ. Microbiol. 33:289-297.
- Wilke, G.R. 1975. Cellulose as a chemical and energy source. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5.
- Wood, T.M. y S.I. McCrae. 1978. The cellulase of Trichoderma kohnigii. Biochem. J. 171:61-72.
- Zeikus, J.G. 1979. Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enz. Microb. Technol. 1:243-251.
- Zeikus, J.G., P.W. Hegge y M. Anderson. 1979. Thermoanaerobacterium brockii: a new caldoactive anaerobic bacterium. Arch. Microbiol. 122:41-47.
- Zeikus, J.G., T.K. Ng, R.J. Lamed y A. Ben-Bassat. 1980. Second International Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering, New Delhi.
- Zeikus, J.G. 1980. Chemical fuel production by anaerobic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34:423-464.
- Zieg, J., M. Shiverman, M. Hilmen y M. Simon. 1977. Recombinational switch for gene expression. Science 196:170-172.
- Zieg, J., M. Hilmen y M. Simon. 1978. Regulation of gene expression by site-specific inversion. Cell 15:237-244.
- Zieg, J. y M. Simon. 1980. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:4196-4200.

